VISIT…

LANZAROTE
Caliente.COM

ROBERT K. SCOPES

PROTEIN PURIFICATION

Principles and Practice

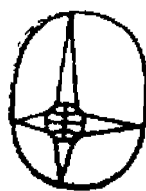
With 145 Figures

SPRINGER — VERLAG
NEW YORK HEIDELBERG BERLIN

Р. СКОУПС

МЕТОДЫ ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

Перевод с английского
проф. В. К. Антонова



«МИР» МОСКВА 1985

УДК 577.112.083
С 44
ББК 28.072

Скоупс Р.

С 44 Методы очистки белков: Пер. с англ.—М.: Мир, 1985.—358 с., ил.

Книга известного австралийского биохимика, написанная на основе собственного 20-летнего опыта работы в области препаративной биохимии. Изложены принципы и методы основных способов выделения и очистки белков, определения их концентрации и ферментативной активности.

Предназначена для биохимиков, иммунологов, химиков и других специалистов, занимающихся выделением и очисткой белков.

С $\frac{2001040000-508}{041(01)-85}$ 130—85, ч. 1

ББК 28.072
57.04

Редакция биологической литературы

© 1982 by Springer-Verlag New York Inc.
All rights reserved
Authorized translation from English language edition published by Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo
© перевод на русский язык, «Мир», 1985

ОТ ПЕРЕВОДЧИКА

Выделение и очистка белков во многом представляют собой самостоятельную область биохимии, и достигнутые здесь успехи в значительной мере предопределили тот огромный прогресс в наших знаниях о химии живого, который наблюдается в последние десятилетия. Овладеть этой наукой не так просто. Для этого мало знать теоретические основы используемых методов — необходимо также научиться искусно обращаться с белками, и здесь советы «бывалых» людей крайне ценны.

Предлагаемая вниманию читателя книга — это не теоретическое руководство и не свод практических методик, а скорее систематизированный сборник именно таких советов. В этом отношении она будет очень полезна исследователям, которые еще только начинают входить в эту область. Это не означает, что автор пренебрегает теоретическими обоснованиями своих рекомендаций. Во многих случаях теория изложена достаточно подробно, но делается это так, что суть метода может понять даже человек, весьма далекий от проблем физической химии.

С каждым годом появляются все новые, весьма изощренные методы белковой химии. В книге освещены многие последние разработки, хотя некоторые из них, например жидкостная хроматография высокого давления, лишь кратко упоминаются. Но если исследователь усвоил важнейшие приемы работы с белками, ему уже не так трудно овладеть и новыми методами.

Таким образом, эта книга не повторяет многочисленных руководств по очистке белков, существующих в мировой литературе и тем более таких руководств на русском языке. Она наверняка найдет своего читателя, особенно среди студентов, аспирантов и молодых исследователей, сталкивающихся с трудностями при выделении и очистке белков. Однако и искушенный специалист в данной области узнает из этой книги много для себя полезного.

В заключение мне хотелось бы поблагодарить И. В. Антонова и О. П. Чвилеву за помощь в переводе и подготовке русского издания к публикации.

В. К. Антонов

ПРЕДИСЛОВИЕ

Эта книга — итог двадцатилетних исследований, связанных с очисткой ферментов. Они были начаты отчасти потому, что в то время, когда я работал над докторской диссертацией и мне понадобилась креатинкиназа для регенерации АТР, мы не могли позволить себе покупать препараты очищенных ферментов, да и вряд ли они были тогда в продаже. Я до сих пор испытываю удовольствие, если мне удается выделить достаточно чистый фермент из сложной смеси белков; движимый лишь желанием испытать свои силы и из чисто академического интереса я и теперь провожу много времени за очисткой ферментов, даже если конечный продукт мне, по существу, и не нужен. В те дни все приходилось проверять опытным путем: подбирали условия фракционирования белков сульфатом аммония и органическими растворителями, пробовали, адсорбируется ли фермент на кальций-фосфатном геле. Больше практически ничего и не было. В настоящее же время мы располагаем огромным разнообразием методов, материалов и подходов к проблеме очистки ферментов. Трудности сейчас заключаются не в том, чтобы умело манипулировать несколькими доступными приемами, а в том, чтобы суметь выбрать наиболее подходящий метод из огромного их множества.

Цель этой книги — ознакомить новичков в данной области со всем арсеналом существующих сейчас методов фракционирования белков и проанализировать их достоинства и недостатки с тем, чтобы исследователь смог выбрать метод, который позволил бы решить стоящую перед ним задачу. Наряду с такими традиционными приемами, как фракционирование белков солями, здесь представлены также многие современные достижения в аффинной хроматографии и сходных с ней методов. Хотя все эти новые методы в целом ряде случаев дали блестящие результаты, оказалось, что с их помощью нельзя разрешить все проблемы. В течение двух лет, пока готовилась рукопись данной книги, появилось много новых методик и, что не менее важно, было выпущено много новых химических препаратов. По мере поступления в продажу новых материалов мы вно-

сили в рукопись соответствующие дополнения, однако к тому времени, когда будет опубликована эта книга, таких материалов, несомненно, станет еще больше. В некоторых случаях новый препарат имеет настолько большие преимущества, что быстро вытесняет все прежние аналогичные ему препараты. Однако все чаще возникает вопрос о соотношении эффективности методик и материалов и их стоимости: новая система может быть самой лучшей из всех существующих, но не нанесет ли она непоправимый урон нашему бюджету? Я убежден, что именно по этой причине старые, более дешевые химические препараты (и классические методы) будут служить нам еще много лет.

Несколько слов о назначении книги. Она не является исчерпывающей сводкой всех методов, когда-либо использовавшихся при очистке ферментов; в ней не приводится подробных примеров и не дается точных инструкций. В противном случае она заняла бы гораздо больше места на полке и лишь дублировала бы уже опубликованные прекрасные многотомные трактаты, такие в частности, как «Methods in Enzymology», «Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology» и «The Proteins» (3-е издание, том 1, под ред. Нейрата и Хилла). Вместо этого книга содержит краткое описание основных приемов очистки ферментов и довольно простые (даже упрощенные) объяснения теории и термодинамики происходящих при этом процессов. Предполагается, что читатель знаком с основами биохимии и белковой химии, и у него есть учебники по структуре белка, простейшей ферментативной кинетике и термодинамике. Цель книги — помочь всем студентам и научным сотрудникам в их работе по выделению ферментов, независимо от того, какой исходный материал они используют и реализуют ли они какую-то новую программу или просто воспроизводят уже описанную методику.

В большинстве случаев термины «фермент» и «белок» в этой книге взаимозаменяемы. Все ферменты представляют собой белки, но не наоборот: не все белки обладают ферментативной активностью. В основном я использую термин «фермент», когда речь идет о конкретном белке, подвергаемом очистке (хотя он может и не быть ферментом), и термин «белок», когда речь идет либо о смеси белков, либо о белках, отличных от очищаемого белка.

Книга, подобная этой, может удовлетворить широкий круг читателей. К ним относятся по крайней мере три следующие категории: 1) те, кто занимается очисткой белка, который никогда еще не был выделен ни из одного источника; 2) те, кто выделяет белок из нового источника при наличии адекватного метода, использованного для очистки того же белка из другого

источника, и 3) те, кто просто воспроизводит какую-то конкретную методику, пытаясь получить чистый белок, идентичный уже полученному ранее. Что касается первой категории, то сейчас все реже можно встретить исследователей, занимающихся очисткой ранее неизвестных ферментов, просто потому, что обнаруживается все меньше новых ферментов и, вероятно, осталось совсем мало еще неоткрытых. Вторая категория, т. е. люди, выделяющие ферменты из новых источников, встречается теперь чаще, чем раньше: биохимики уже не ограничиваются такими источниками, как *E. coli*, дрожжи, печень крысы, мышечная ткань кролика, сердце свиньи и шпинат. Даже небольшой сдвиг в эволюционном плане (например, от свиного сердца к бычьему) влечет за собой изменения в поведении не только выделяемого фермента, но, что не менее важно, и других присутствующих в экстракте белков. Многие стандартные методы настолько сильно зависят от определенных условий, что замена исходного материала может привести к полной неудаче из-за каких-то незначительных изменений в свойствах белка. В то же время молекулярная масса любого фермента обычно мало меняется даже у видов, стоящих на отдаленных ступенях эволюции. Некоторые другие свойства ферментов, например поведение при ионном обмене (зависящее от изоэлектрической точки белка), лишь в редких случаях сильно варьируют в пределах такой таксонометрической единицы, как тип; растворимость же белков при этом практически не изменяется.

Третья категория читателей включает тех, кто намеревается выделить точно такой же препарат, который кто-то уже получил. В том случае, если достаточно важные детали не были упущены в опубликованной методике, а исходный материал и условия проведения работы идентичны, дальнейшая помощь не нужна; к сожалению, эти требования не всегда соблюдаются. Так как в большинстве случаев начинающие не имеют ни опыта, ни знания общих принципов очистки белков, они или совсем не могут воспроизвести метод, или воспроизводят его лишь при повторных попытках. К тому же, если метод не дает удовлетворительных результатов, они боятся хоть на йоту отступить от описания, что нисколько не улучшает положения. Этим людям я бы посоветовал использовать имеющуюся информацию, но, если что-то не получается, не бояться изменить условия (возможно, что в описании методики допущена ошибка или какая-то опечатка не исправлена при чтении корректуры, и все это может привести к потере нескольких месяцев); не стоит также волноваться из-за отсутствия, например какого-нибудь ротора PX28 для центрифуги SS26 модель D, если он требуется всего лишь для получения осадка. Если все же положение не исправляется, следует ввести более серьезные изменения, использовав

новые материалы или методы, разработанные уже после появления оригинальной публикации. При подборе условий полезно многократно изменять различные параметры до тех пор, пока не будет найдено идеальное их сочетание. На это уходит много времени, но в итоге затраченные усилия оправдываются, так как вы можете быть уверены в воспроизводимости методики, если известны пределы, в которых допустимо изменение условий на каждом этапе.

В заключение мне бы хотелось выразить благодарность многим студентам и преподавателям Университета Ла Тробе за их долголетнее участие в совместной работе.

Я хотел бы также поблагодарить проф. К. Мосбаха, д-ра К. Р. Лоу, д-ра И. П. Трайера, д-ра К.-И. Ли и д-ра Ф. фон дер Хаара за предоставление оттисков и препринтов их работ по очистке ферментов. Я благодарен Австралийскому комитету научно-исследовательских фондов за финансовую поддержку.

Бандора, Виктория
Австралия

Роберт К. Скоупс

ГЛАВА 1

ЛАБОРАТОРИЯ ОЧИСТКИ ФЕРМЕНТОВ

Эта глава знакомит читателя с основными методами и оборудованием, применяемым при очистке ферментов. Проводить очистку ферментов можно с помощью сравнительно простого оборудования; к предметам первой необходимости относятся лишь центрифуги и УФ-спектрофотометр. Конечно, использование более сложного оборудования и автоматических систем значительно облегчает жизнь, но требует больших расходов. В этой книге не раз будет подчеркиваться, что выделение ферментов следует проводить без промедления. Любая процедура, основанная на применении медленно функционирующего, ненадежного или не всегда доступного оборудования, чревата опасностью потерять фермент. Используя только сравнительно простые и обычные приборы, можно, как правило, работать без задержек. Мысль ясна — всегда следует сначала использовать самые простые приемы и только в случае неудачи прибегать к специальным методам.

1.1. ОБОРУДОВАНИЕ, СПЕЦИАЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ И РЕАКТИВЫ

Существует множество сложных и тонких приспособлений, предназначенных для разделения белков, и так же, как в любой другой сфере жизни, оборудование в этой области все более автоматизируется ради удобства и простоты в обращении. Однако, по мере того как приборы усложняются, превращаясь, по существу, в «черные ящики», контролируемые микропроцессорами, мы все более удаляемся от реальности происходящего и в какой-то степени все меньше контролируем то, что хотим делать. Бóльшая часть сложнейшего оборудования предназначена для надежного воспроизведения рутинных операций и потому не всегда пригодна для разработки новых методов. Но, помимо этих соображений, необходимо принимать во внимание и стоимость такого оборудования; часто полезнее приобрести

два дешевых прибора вместо одного самого дорогостоящего; средства, потраченные на простейшие приспособления, такие, как пипетки, пробирки, стаканы, скорее окупятся, чем затраты на оборудование, предназначенное для очистки какого-то одного белка, так как оно будет использоваться не очень часто и к тому же может прийти в негодность.

Остается сказать о том минимуме основного оборудования, который должна иметь в своем распоряжении каждая лаборатория по очистке ферментов. Активность ферментов обычно измеряют с помощью спектрофотометрических или радиохимических методов. Если все определения проводят спектрофотометрическим способом, то можно обойтись и без сцинтилляционного счетчика. Спектрофотометр же обязательно должен быть в лаборатории, так как он требуется, кроме того, и для измерения концентрации белков (разд. 8.5). К оборудованию первой необходимости относится спектрофотометр с УФ-лампой, желательно с самописцем для записи хода реакций во времени.

При очистке ферментов лишь в редких случаях можно избежать центрифугирования. В промышленных масштабах для отделения осадка обычно используют фильтрационные системы, но в лаборатории более удобна центрифуга. Принципы и методы центрифугирования изложены ниже (разд. 1.2). В большинстве случаев нужна стандартная постоянно работающая центрифуга с охлаждением до 0 °С или немного ниже; при этом эффективность центрифугирования, выражающаяся произведением относительной величины *g* на емкость в литрах, должна быть порядка 10 000—15 000. Можно использовать множество центрифуг других типов — от настольных до препаративных ультрацентрифуг. Но они не всегда нужны и вряд ли будут применяться при очистке ферментов так же часто, как типовая центрифуга, описанная выше.

Колоночная хроматография настолько широко распространена, что в лаборатории совершенно необходимо иметь соответствующее оборудование. Разделение на колонке можно проводить и с помощью самодельной стеклянной трубки или шприца (разд. 1.3), а фракции собирать вручную и затем спектрофотометрировать каждую пробирку. Однако работа идет намного эффективнее и с меньшими затратами труда при использовании автоматизированного устройства, которое стóит примерно столько же, сколько спектрофотометр, но дешевле центрифуги. Набор таких приспособлений состоит из колонок разных размеров, коллектора фракций с УФ-приставкой, перистальтического насоса и магнитной мешалки (для создания градиента). Необходимо иметь в своем распоряжении колонки разной формы и размера, чтобы можно было использовать для набивки колонки оптимальное количество адсорбента, соответ-

ствующее количеству образца. Наиболее пригодны для этой цели колонки с регулируемым плунжером (адаптером). Размеры колонок, используемых для удаления солей методом гель-фильтрации, описаны в разд. 1.4. Для адсорбционной хроматографии могут потребоваться колонки других размеров. Лучше приобрести две (или более) простые колонки, чем одну, приспособленную только для определенных целей.

Нужны также гомогенизаторы для разрушения клеток (они описаны в разд. 2.2). Такое обычное лабораторное оборудование, как весы, pH-метр, мешалки, аппараты для производства льда, необходимы при очистке ферментов так же, как и при использовании любой другой биохимической методики. Измерение объемов можно производить с помощью градуированных цилиндров (а в редких случаях, если необходима большая точность, мерных колб), пипеток и (для малых объемов) микролитровых шприцев. При анализе ферментов часто требуется отмерить очень малый объем исследуемого раствора, например менее 1 мкл. Современные шприцы позволяют осуществлять добавление таких объемов с достаточной точностью. Желательно иметь шприцы объемом от 0,5 до 250 мкл. Кроме того, очень удобны регулируемые пипетки типа «Eppendorf» с набором наконечников объемом от 5 мкл до 5 мл.

Электрофоретический анализ смеси белков проводят с помощью гель-электрофореза или изоэлектрического фокусирования, чаще всего в полиакриламидном геле с додецилсульфатом в качестве денатурирующего агента или без него. Методика описывается в разд. 9.1. В настоящее время в продаже имеется много прекрасного оборудования; начинающим можно посоветовать сразу же приобрести прибор для тонкослойного электрофореза. Пожалуй, сейчас в мире мало найдется биохимических лабораторий, в которых не было бы оборудования для аналитического гель-электрофореза.

При очистке белка применяется целый ряд специальных реактивов. Это в основном адсорбенты для колоночной хроматографии и различные часто используемые химические вещества. В лаборатории должны быть ионообменники (разд. 4.3), все необходимое для гель-фильтрации (разд. 5.1) и аффинные адсорбенты (разд. 4.5). Очень важны и более обычные вещи, например трубки для диализа (разного размера), а также различные буферные растворы (разд. 6.1), запас достаточно чистого сульфата аммония (разд. 3.3), тиоловые реактивы, такие, как 2-меркаптоэтанол и дитиотреитол, ЭДТА (этилендиаминтетрауксусная кислота), додецилсульфат натрия, протаминсульфат, фенилметилсульфонилфторид, реактив Фолина — Чиокальтеу, кумасси синий и т. д.; их использование будет описано в разных разделах этой книги.

1.2. ОТДЕЛЕНИЕ ОСАДКОВ И НЕРАСТВОРИМЫХ ВЕЩЕСТВ

Фильтрация

Появление в лабораториях эффективных центрифуг с охлаждением дало возможность использовать более чистый и совершенный по сравнению с фильтрацией способ отделения белковых и других осадков, особенно при работе с малыми объемами. Однако бывают случаи, когда фильтрация предпочтительнее. При проведении крупномасштабной работы центрифугирование больших объемов может потребовать применения нестандартного оборудования, например проточной насадки (адаптера) (рис. 1.1); во всяком случае, этот процесс может быть таким же длительным, как и фильтрация. С другой стороны, большинство биологических материалов дают обильные и рыхлые осадки, которые быстро закупоривают фильтры, так что вскоре после начала фильтрации скорость потока резко уменьшается и фильтрация почти прекращается даже при отсасывании. В этой ситуации необходимо заменить фильтрующий материал. В производственных условиях можно использовать специальные жесткие фильтры с автоматическим соскабливающим устройством для удаления слизистого осадка по мере его накопления, но такие системы обычно не применяются в лаборатории.

Процесс фильтрации может быть значительно ускорен, если использовать целит — диатомовую землю, состоящую в основном из SiO_2 (рис. 1.2). Наилучшие результаты получают при смешивании целита с фильтруемым образцом и последующем пропускании его через бюхнеровскую воронку под небольшим вакуумом. Целит создает очень большую поверхность, задерживающую студенистый осадок, что позволяет получить значи-

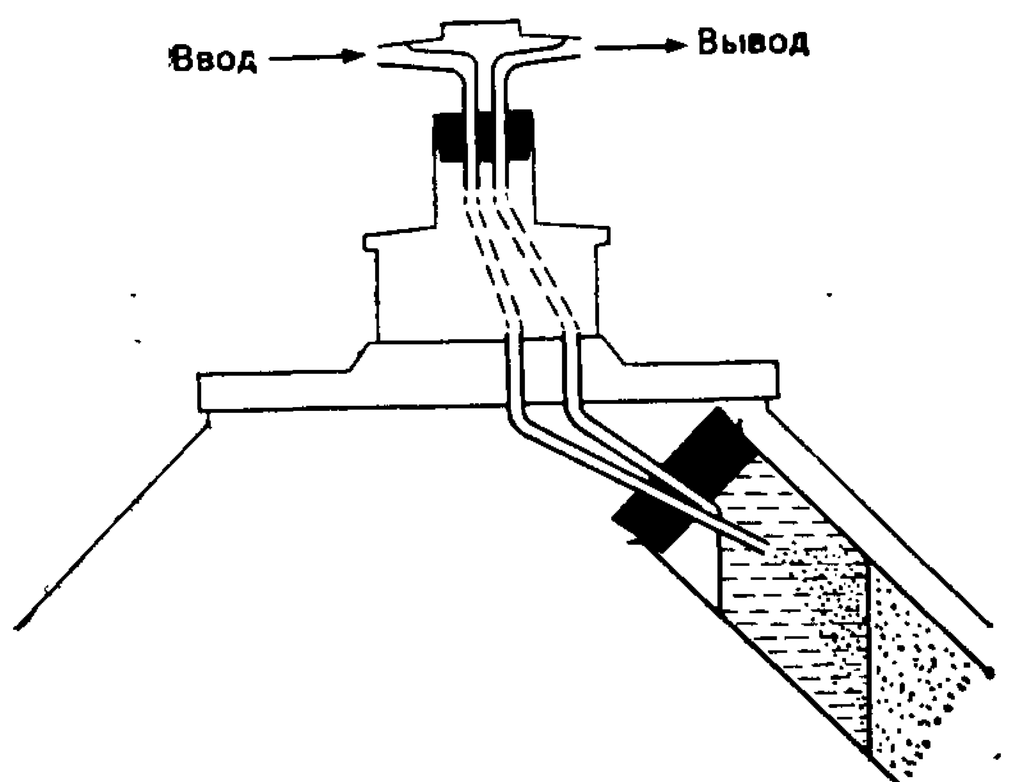


Рис. 1.1. Упрощенная схема проточного адаптера для ротора центрифуги «Sorvall SS-34». Раствор может подаваться со скоростью нескольких сотен миллилитров в 1 мин, при этом собирается до 300 см³ осадка.

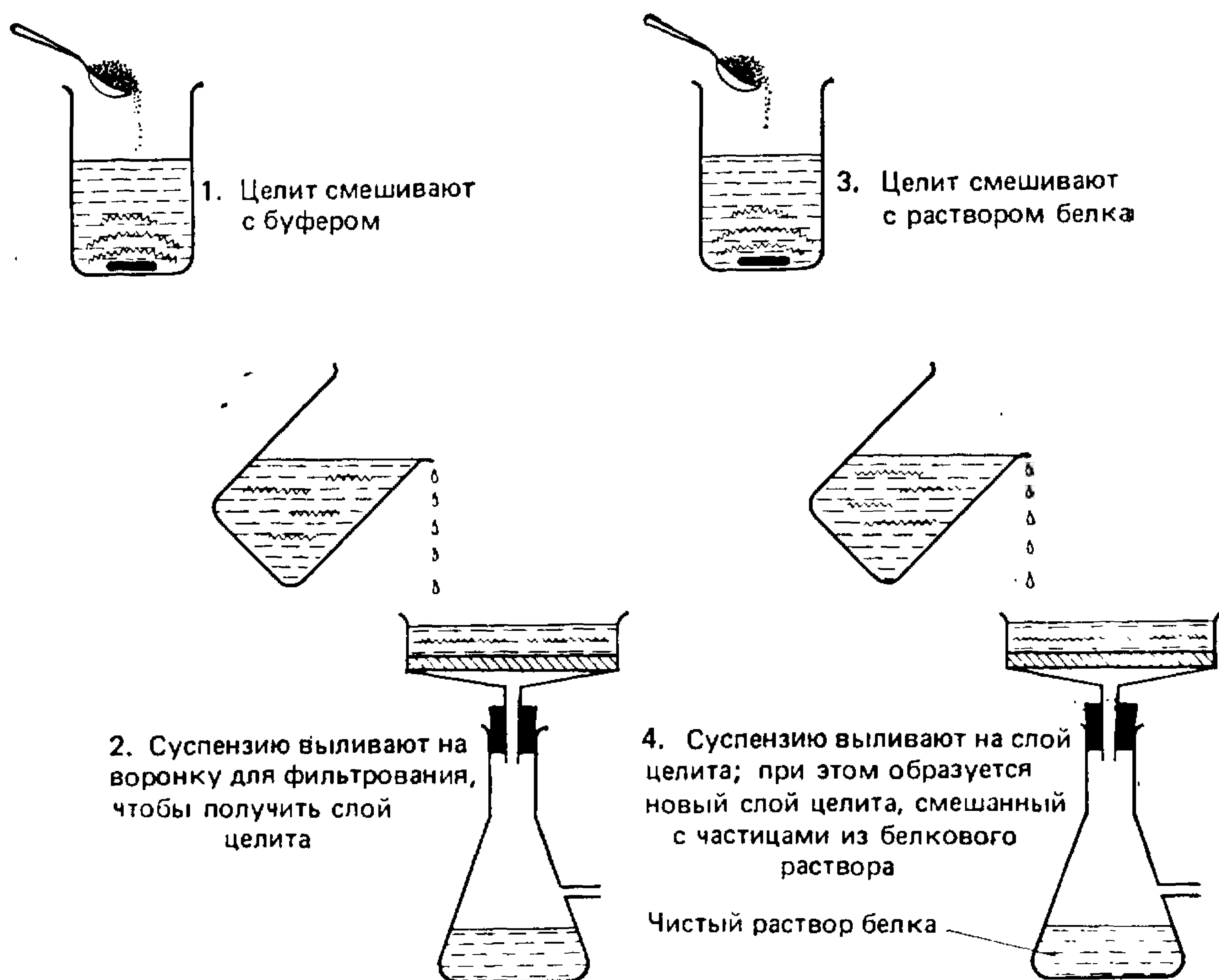


Рис. 1.2. Использование целита как фильтрующего средства для осветления белковых растворов.

тельно больше фильтрата, прежде чем произойдет засорение фильтра. Этот способ используется в основном для удаления небольших количеств нежелательных нерастворимых веществ, но не приводит к успеху при работе с большими количествами осадка.

Для удаления комков, волос, грязи, нерастворимых солей и т. д. используют фильтрацию через бумагу Whatman № 54, причем эта процедура обязательно должна предшествовать работе на колонке. Перед нанесением белкового раствора на колонку можно провести также центрифугирование.

Последним достижением в области крупномасштабной ультрафильтрации (с применением давления для продавливания раствора через мембрану, задерживающую крупные частицы) является кассетная система «Pellicon», выпускаемая фирмой Millipore. Эта установка, в которой общая площадь фильтра составляет не менее 2 м^2, задерживает мелкие частицы, причем скорость фильтрации достигает 1 л/мин. Систему «Pellicon» очень удобно использовать для концентрирования микроорга-

низмов перед тем, как центрифугировать их с целью получения плотного осадка. В результате фильтрации получается не «пасга», а просто более концентрированная суспензия.

Центрифугирование

Центрифугирование основано на седиментации частиц в возрастающем гравитационном поле. Силы, действующие на частицу, показаны на рис. 1.3. Для твердых сферических частиц время, необходимое для осаждения частицы в данной среде от мениска до дна пробирки, выражается следующей формулой:

$$t = \frac{9}{2} \frac{\eta}{2\omega^2 r^2 (\rho - \rho_0)} \ln \frac{x_b}{x_t}, \qquad (1.1)$$

где x_t — расстояние от оси вращения до мениска, x_b — расстояние от оси вращения до дна пробирки, остальные символы даны в подписи к рис. 1.3. Таким образом, t прямо пропорционально вязкости и обратно пропорционально разности плотностей, квадрату радиуса частицы и квадрату угловой скорости. Остальные факторы представляют собой геометрические параметры для данного ротора. Отсюда видно, что если радиус частицы при прочих равных условиях уменьшается в два раза, то угловая скорость должна увеличиться тоже в два раза, для того чтобы осаждение частицы заняло столько же времени. Более важной величиной является разность плотностей; она вели-

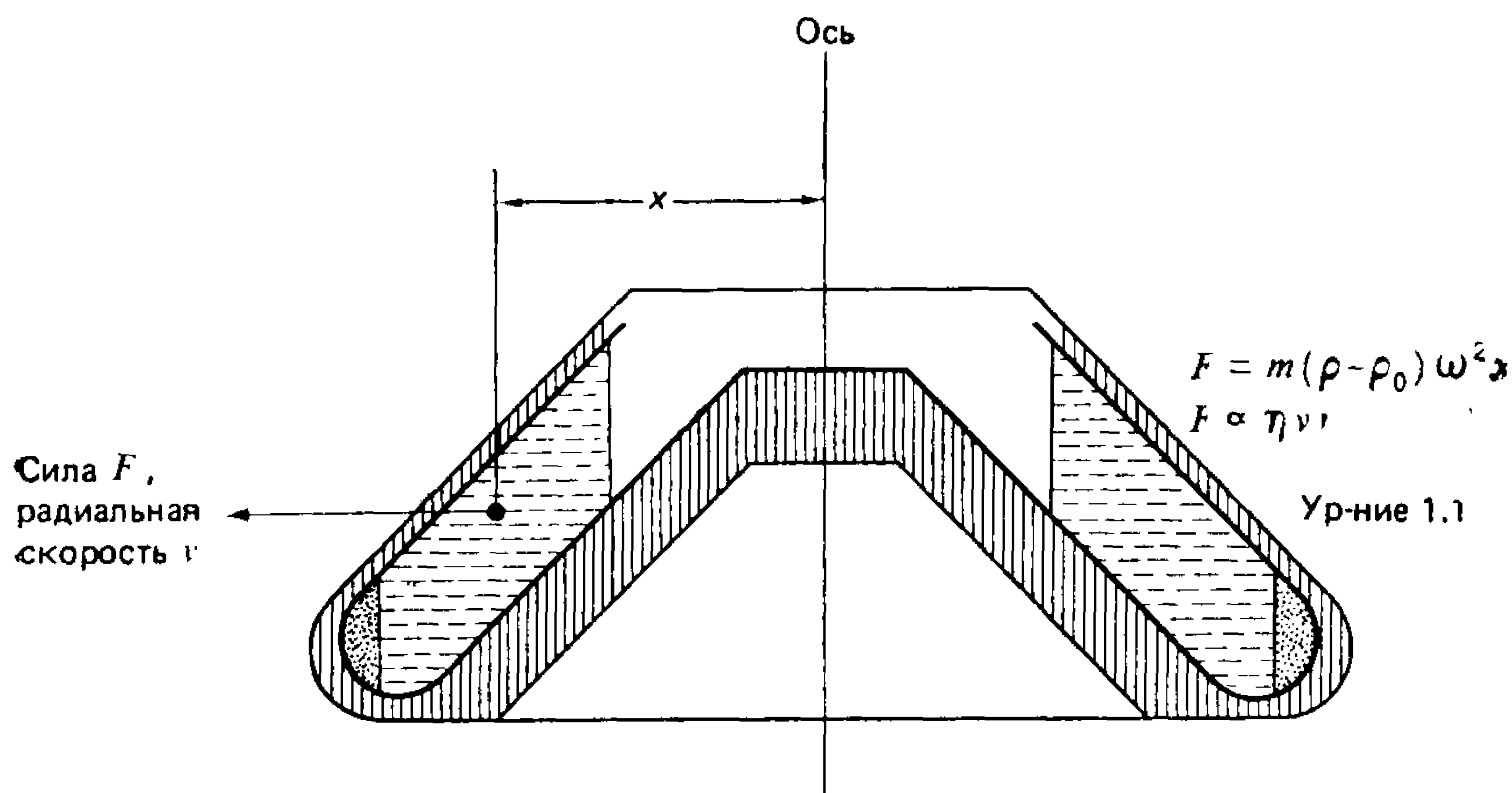


Рис. 1.3. Силы, действующие на частицу в роторе центрифуги. Обозначения: m — масса частицы, ρ — плотность частицы, ρ_0 — плотность раствора, ω — угловая скорость ротора, η — вязкость раствора, r — стоксовский радиус частицы.

ка для водных растворов низкой концентрации, но, когда концентрация соли приближается к той, которая требуется при высаливании белков (разд. 3.3), эта разность может быть очень мала. Плотность безводных белков составляет около 1,34, а агрегированные белковые частицы содержат примерно 50% белка и 50% связанного раствора. Таким образом, ρ белкового агрегата в воде составит $\frac{1}{2}(1{,}34+1)=1{,}17$ ($\rho-\rho_0=0{,}17$), тогда как в растворе сульфата аммония при 80%-ном насыщении ρ будет близко к 1,27; при этом $\rho_0=1{,}20$ ($\rho-\rho_0=0{,}07$). С другой стороны, плотность 33%-ного ацетона равна 0,93, и, следовательно, ($\rho-\rho_0$) равно 0,20, т. е. даже больше, чем в чистой воде. Этот пример иллюстрирует преимущества использования органических растворителей для осаждения белков (разд. 3.4), особенно в случае плотных вязких растворов; осаждение при этом происходит быстрее.

При очистке фермента оптимальным считают центрифугирование, при котором получают плотный осадок и прозрачную надосадочную жидкость; для этого можно пойти на увеличение времени центрифугирования. Осадки, полученные высаливанием, изоэлектрическим осаждением, осаждением в органических растворителях и другими методами, описанными в гл. 3, обычно центрифугируют при 15 000 g в течение 10 мин или при 5000 g в течение 30 мин. Следует отметить, что при работе с малыми объемами центрифугирование при 5000 g в течение 30 мин может дать удовлетворительные результаты, если расстояние от мениска до дна пробирки равно 5 см. При работе же с бо́льшими объемами, когда это расстояние может достигать 20 см, 30 мин иногда недостаточно. Выше указаны лишь приблизительные величины g, так как при данной скорости вращения g возрастает по мере оседания частиц. Однако, если говорить не о величине g, а о скорости вращения ω, из уравнения (1.1) следует, что время осаждения зависит не от абсолютной длины пути осаждаемой частицы, а от логарифма соотношения x_b и x_t. Эта величина лишь незначительно варьирует в разных центрифугах. Поэтому центрифугирование при 5000 об/мин в течение 30 мин дает сходные результаты во всех центрифугах.

Размер частицы является критическим фактором, определяющим скорость и продолжительность центрифугирования. При любом процессе осаждения приходится иметь дело с частицами самых разных размеров, но величины, указанные выше, обычно бывают достаточны для осаждения всего агрегированного белка, образующего видимую мутность; невидимые в растворе более мелкие белковые агрегаты не осаждаются. Однако многие клеточные органеллы и образующиеся из них фракции ни в коей мере не представляют собой чистый белок. Они

могут содержать много липидного материала, который резко снижает значение ($\rho-\rho_0$) в уравнении (1.1). Это значение может стать даже отрицательным, и в этом случае частицы поднимутся на поверхность в виде флотирующего слоя.

Грубые гомогенаты, содержащие органеллы или их фрагменты, можно фракционировать с помощью дифференциального центрифугирования, при котором величина $\omega^2 t$ возрастает на каждой ступени, и это приводит к последовательному осаждению частиц с постепенно уменьшающейся величиной $r^2(\rho-\rho_0)$. Такое дифференциальное центрифугирование является первым этапом очистки органелл от различных тканей при условии, что нужный фермент находится не в растворимой фракции, а в органеллах.

Современные центрифуги представляют собой надежные аппараты, сконструированные так, что они могут нормально функционировать даже при некоторых нарушениях правил эксплуатации. В случае же серьезных неполадок они автоматически отключаются. Важнейшая неполадка — это неуравновешенный ротор. Причиной разбалансировки может быть разбившаяся во время центрифугирования пробирка или просто неточное уравновешивание пробирок. Ясно, что уравновешенные пробирки нужно располагать в роторе одну против другой, или если

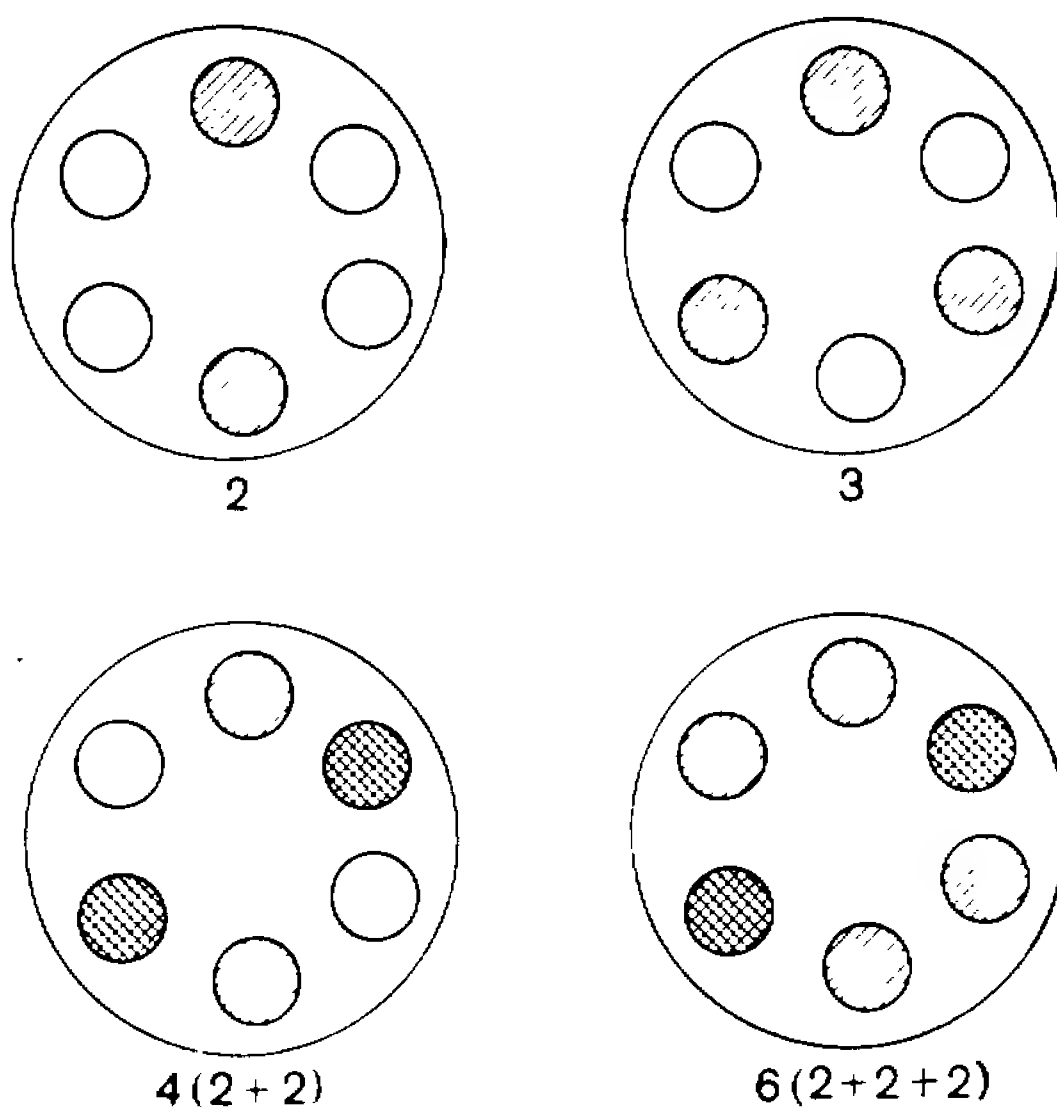


Рис. 1.4. Расположение 2, 3, 4 и 6 пробирок в шестигнездном роторе центрифуги. При центрифугировании 4 и 6 пробирок нужно уравновешивать только пробирки, стоящие друг напротив друга (заштрихованы).

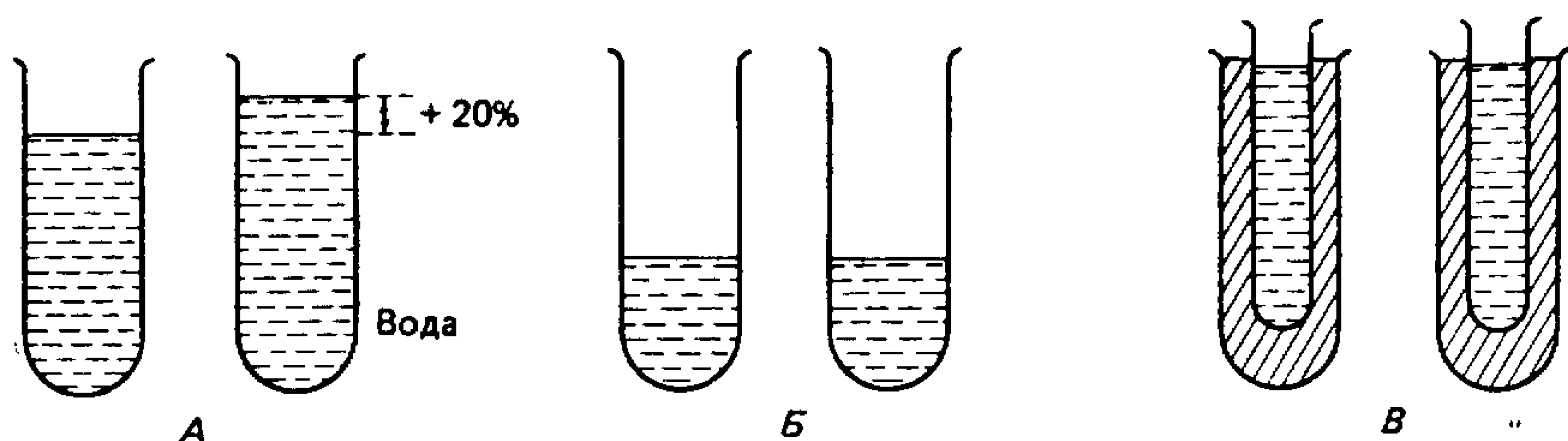


Рис. 1.5. Разные способы уравновешивания раствора большой плотности в паре центрифужных пробирок. *А*. При работе с небольшими объемами грубое уравновешивание массы пробирок достигается увеличением объема воды в одной из пробирок. *Б*. При работе с раствором большой плотности предпочтительнее по сравнению с *А* частичное заполнение обеих пробирок при условии, что они сделаны из достаточно жесткого материала и не сжимаются при центрифугировании. *В*. Идеальное решение этой задачи состоит в заполнении обеих пробирок раствором большой плотности с использованием при необходимости вкладышей для данного ротора.

ротор шестигнездный (либо с бо́льшим числом гнезд, кратным трем), то три одинаково уравновешенные пробирки ставят так, как это показано на рис. 1.4.

Хотя небольшие пробирки можно уравновешивать по объему на глаз, объемы, превышающие 200 мл, следует взвешивать, чтобы избежать дисбаланса. Это относится, однако, только к тем случаям, когда в пробирках находится один и тот же раствор. Если же пробирку с образцом, содержащимся, например, в растворе сульфата аммония 80%-ного насыщения (плотность около 1,20), уравновешивают водой, то при этом потребуется очень большой объем воды (рис. 1.5). И это не совсем правильный способ уравновешивания, так как а) одинаковой должна быть инерция, а не масса раствора и б) по мере осаждения частиц в пробирке инерция возрастает. Лучше использовать две пробирки, заполненные менее чем наполовину (при условии, что пробирки сделаны из достаточно жесткого материала, выдерживающего заданную величину *g*), либо пробирки меньшего размера с адаптером, либо другой ротор. Центрифужные пробирки из полипропилена или поликарбоната достаточно прочны и могут быть использованы для разных целей. В некоторых случаях нужны стеклянные центрифужные пробирки, но пробирки из обычного стекла (Pyrex) выдерживают только 3000—4000 *g*; специальные пробирки из прочного стекла (Corex) выдерживают до 15 000 *g*.

В заключение необходимо сказать несколько слов о бережном обращении с центрифугами. Хотя биохимики редко используют кислоты или щелочи, обладающие высокой коррозионной активностью, они не всегда представляют себе, насколько

коррозионноактивными могут быть простые соли. Роторы центрифуг, отлитые из сплавов алюминия, сильно корродируют при контакте металла с такими солями, как сульфат аммония. Следует немедленно промыть центрифугу, если в нее попала какая-нибудь жидкость; лучше же всего мыть и протирать ротор центрифуги после каждого центрифугирования или по крайней мере каждый день. Загрязнение наружной поверхности центрифужных пробирок солевыми растворами (при погружении их для охлаждения в ледяную баню с солью) может быть причиной появления коррозионных пятен внутри ротора, если его не промывать достаточно часто. Следует также обратить внимание на то, что постоянная работа на центрифуге с максимальными скоростями приводит к более быстрому износу как ротора, так и мотора; в большинстве случаев при очистке ферментов достаточно половины этой скорости.

1.3. ПРИНЦИПЫ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Приемы работы с ионообменными колонками, методы гель-фильтрации и т. д. будут детально обсуждаться в гл. 4 и 5. В этом коротком введении даны лишь основные принципы и описано оборудование, используемое в колоночной хроматографии.

Хроматография основана на том, что растворенные вещества отстают от фронта растворителя по мере его продвижения по носителю. Название «хроматография» (от греч. chroma — цвет и grapho — пишу) было впервые использовано для описания разделения природных пигментов в результате разной степени их задержки на листе фильтровальной бумаги (рис. 1.6). Этот принцип до сих пор широко используется и может быть назван одномерной хроматографией, так как лист бумаги практически не имеет толщины. Второе измерение появляется при использовании колонки с носителем, что может быть приравнено к стопке из многих полосок бумаги, как показано на рис. 1.6, *В*. Теперь образец на старте представляет собой диск или цилиндр, а не тонкую линию. По мере прохождения растворителя по колонке вещества, содержащиеся в образце, распределяются следующим образом. Вещества, полностью извлеченные растворителем, движутся вместе с фронтом растворителя ($R_f=1$) и очень быстро вымываются. Вещества, полностью адсорбированные носителем ($R_f=0$), останутся на старте.

Хроматография возможна только в том случае ($0<R_f<1$), когда вещество задерживается в результате частичной адсорбции, но в конечном счете элюируется. Два вещества с очень близкими константами удерживания (R_f) могут быть разделены полностью только при использовании достаточно длинной

А

Б

В

Рис. 1.6. Принципы хроматографии. *А*. Образец, нанесенный в центр кружка фильтровальной бумаги, при добавлении буферного раствора растекается в радиальном направлении и компоненты образца разделяются в виде колец в соответствии со значениями их R_f. *Б*. Одномерная бумажная хроматография дает разделение компонентов образца на полосы. *В*. Введение еще одного измерения, реализуемого в колоночной хроматографии.

колонки и при наличии не слишком большой продольной диффузии. Разделительная способность частично зависит от числа эффективных адсорбционных стадий, из которых состоит весь процесс разделения.

Вследствие того что нанесенный слой образца имеет определенную толщину, число стадий разделения, называемое числом теоретических тарелок, зависит от соотношения длины колонки к толщине слоя образца, а также от зернистости адсорбента и скорости диффузии. Так как любой образец, объем которого не превышает определенной величины, в результате диффузии распределяется примерно в одном и том же объеме, очень важно правильно определить ширину элюируемой фракции. Она зависит как от исходной толщины слоя образца, так и от степени диффузии по мере прохождения образца по колонке. Как мы увидим далее (гл. 4), при колоночной хроматографии обычно производится смена буферных систем, осуществляемая либо

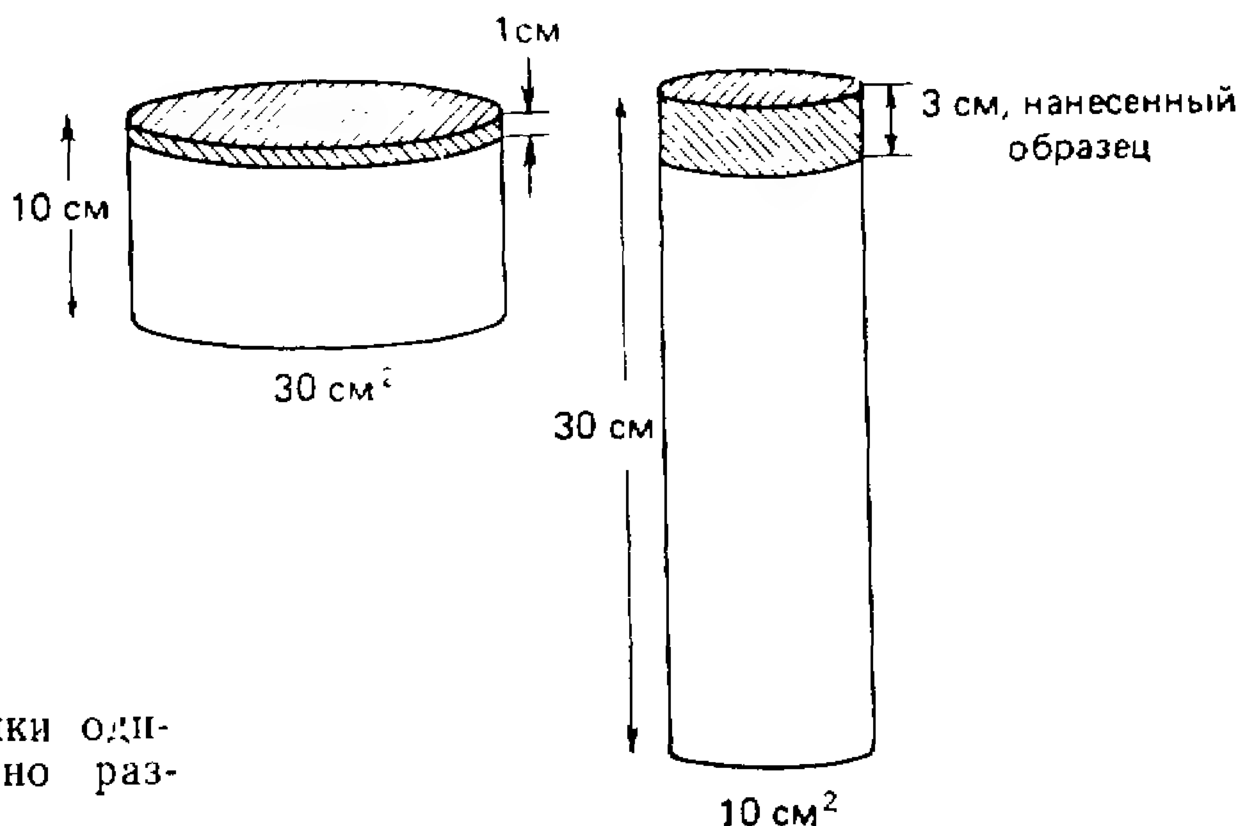


Рис. 1.7. Две колонки одинакового объема, но разных размеров.

ступенчато, либо с использованием градиента. В этих условиях концепция числа тарелок мало пригодна.

Колоночная хроматография — это главный метод разделения ферментов, позволяющий использовать огромное разнообразие адсорбентов. Некоторые адсорбенты обладают очень большой емкостью относительно тех или иных белков (>100 мг$\times$ $\times$см$^{-3}$), тогда как у других адсорбентов емкость может быть в 200 раз меньше указанной. Поэтому размеры колонок, необходимых для разделения, варьируют в широких пределах. Теоретически для идеальной системы форма колонки не имеет значения, так как отношение длины колонки к толщине слоя образца остается неизменным, если объемы адсорбента и образца не меняются (рис. 1.7). Однако размер частиц весьма важен; более тонкое разделение белков достигается при «прохождении» ими большего числа частиц адсорбента, что соответствует большему числу теоретических тарелок. Таким образом, при данном размере частиц адсорбента более длинная колонка имеет определенные преимущества. С другой стороны, в колонке большого диаметра можно использовать более мелкие частицы, так как уменьшение скорости протекания через каждый квадратный сантиметр, обычно неизбежное для таких плотных адсорбентов, компенсируется большим поперечным сечением колонки. На практике, однако, предпочитают использовать более длинные колонки, поскольку идеальные условия работы не соблюдаются, а поток не является достаточно равномерным (см. рис. 5.8 и 5.9). Это приводит к увеличению продолжительности процесса, что может быть нежелательным. В лаборатории должны быть колонки разной емкости (от 1 см^3 до 2 л) и разной формы (от коротких, в которых диаметр приблизительно равен высоте, до длинных, в которых диаметр составляет около 1/30 высоты), и всем им находится применение.

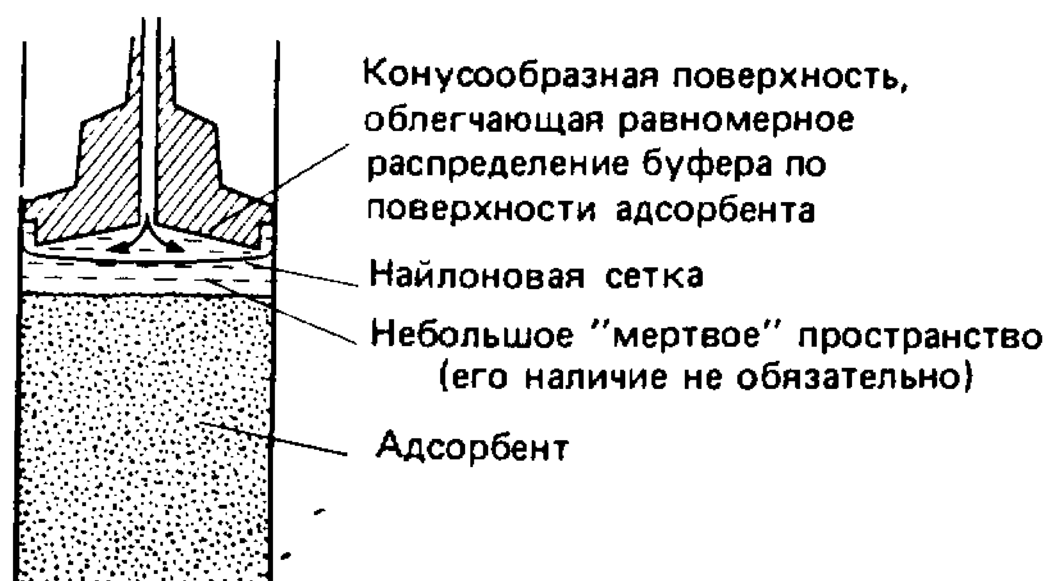


Рис. 1.8. Схема типичного аппликатора для колоночной хроматографии.

Самые лучшие колонки снабжены специальными устройствами для выравнивания верхней и нижней поверхностей носителя, так что равномерный поток жидкости, протекающей вниз по колонке, не нарушается на ее концах. Эффективная пористая сетка или диск на дне колонки дают возможность раствору свободно вытекать в сборное пространство, которое должно иметь минимальный объем, так как это уменьшает смешивание фракций. Для этой же цели во время нанесения образца и последующей элюции буферные растворы следует очень ровно распределять по поверхности носителя (рис. 1.8).

В учебной лаборатории, где работают десятки студентов, по экономическим соображениям невозможно снабдить каждого из них такой колонкой. При работе с малыми объемами можно использовать такие простые и дешевые системы, как пастеровская пипетка с тампоном из стеклянной ваты в месте сужения трубки (рис. 1.9, *А*), шприц с поршнем или без него, имеющий на дне перфорированный пластиковый диск (рис. 1.9, *Б*), или простая стеклянная трубка с резиновой пробкой, вставленной в один из ее концов, и каким-либо фильтром типа пористого диска или слоя фильтровальной ткани, обеспечивающим равномерный сбор элюата (рис. 1.9, *В*). Неравномерный ток жидкости на поверхности носителя может быть причиной ее неравномерного протекания через колонку. Небольшой слой жидкости над адсорбентом позволяет устранить все эти нарушения, если адсорбент представляет собой хорошо уплотняющийся материал и его поверхность не повреждается при перемещении над ней буфера; несколько примеров неравномерного протекания жидкости через колонку показано на рис. 1.10. Так как большинство белковых растворов бесцветны, часто не обращают внимания на то, что колонка работает плохо.

Еще одной причиной нарушения хроматографического процесса может быть неравномерная набивка колонки. Адсорбент фактически всегда состоит из частиц разных размеров; это значит, что при спокойном осаждении более крупные частицы ока-

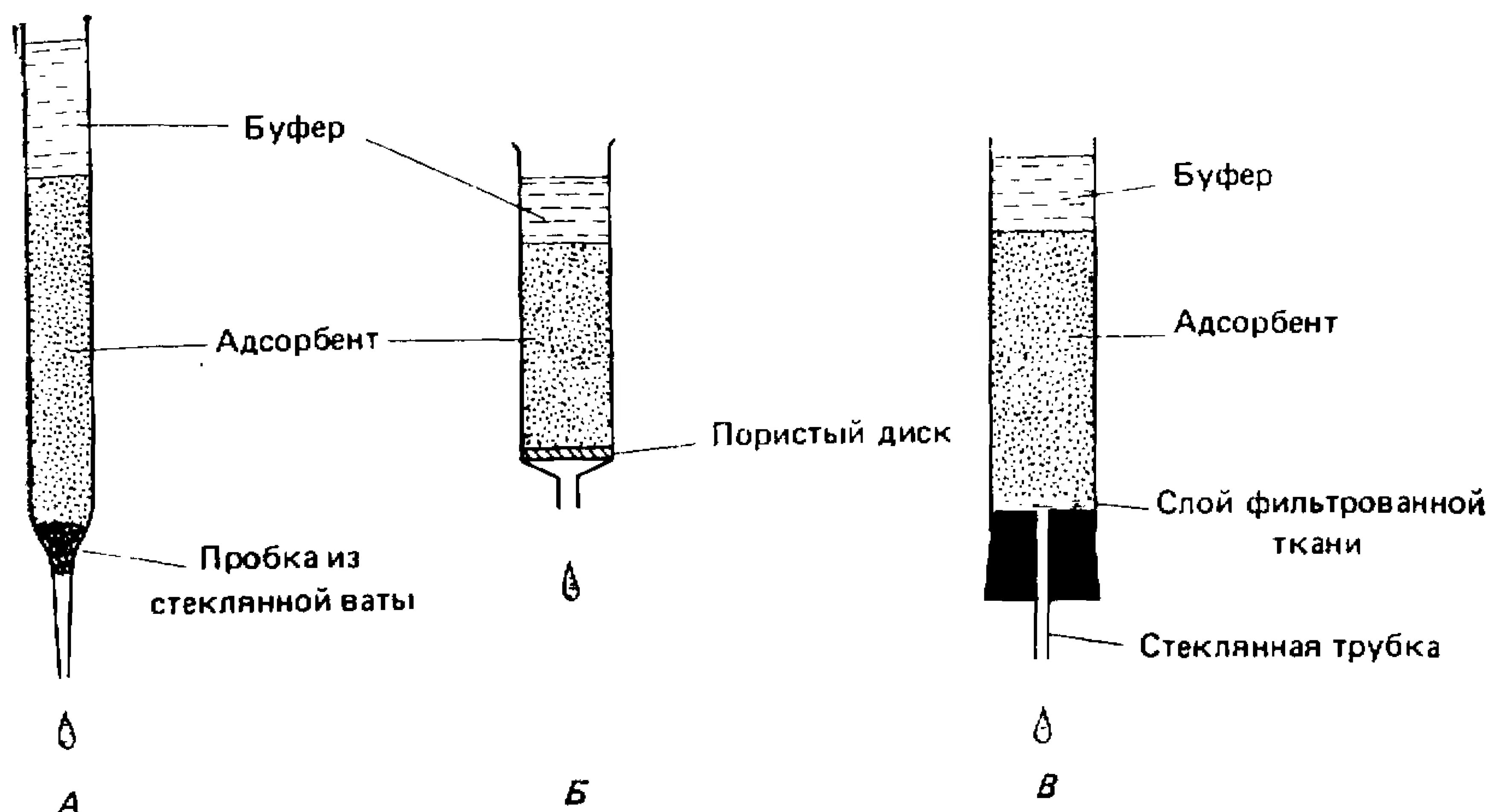


Рис. 1.9. Простейшие колонки: пастеровская пипетка (*А*), шприц (*Б*) и стеклянная трубка (*В*). Все они приспособлены для колоночной хроматографии.

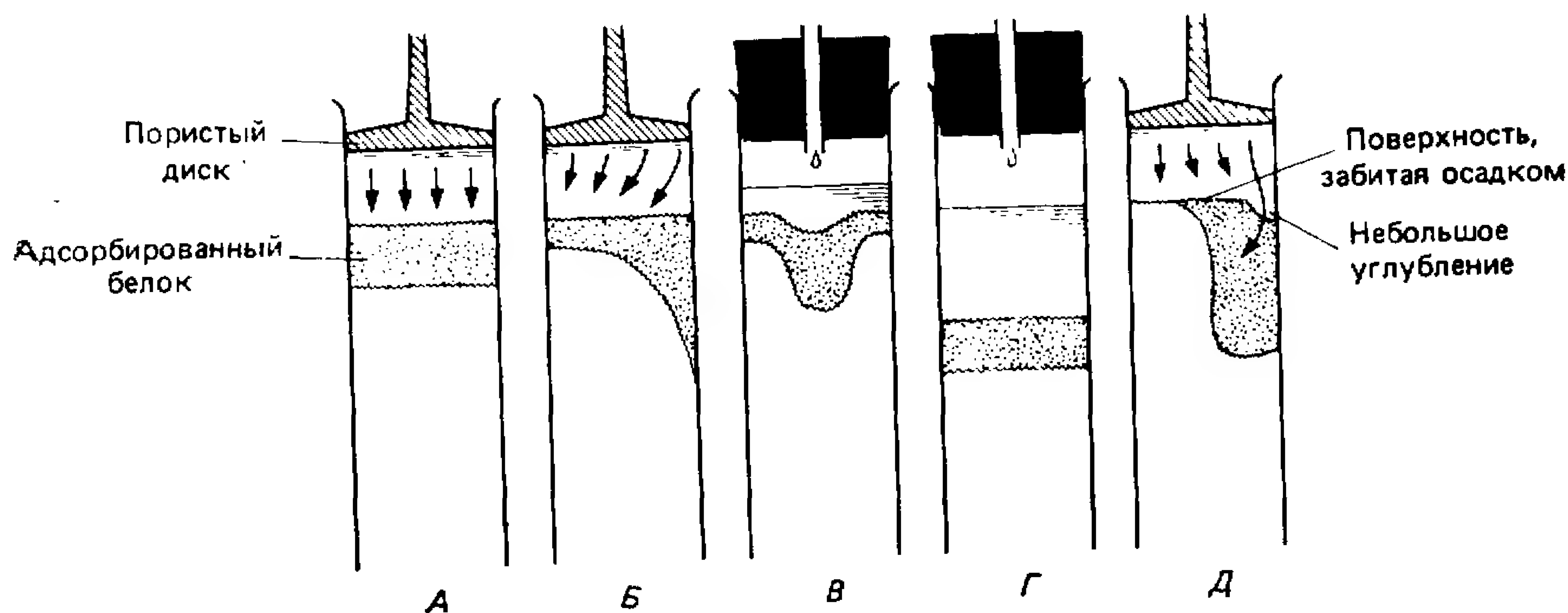
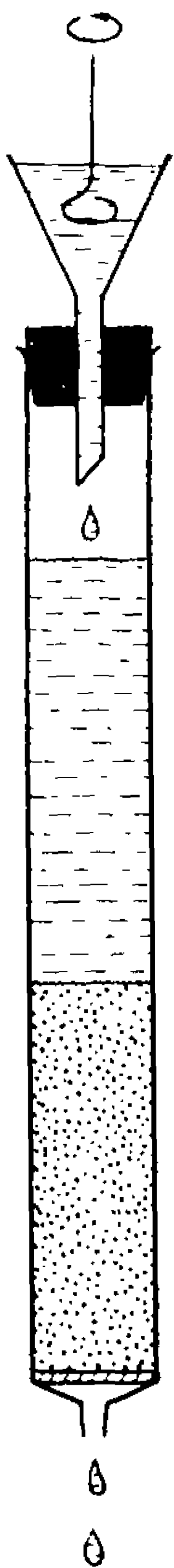


Рис. 1.10. Некоторые сложности, связанные с нанесением образца на колонку. *А*. Идеальная ситуация: жидкость равномерно распределяется по поверхности. *Б*. Из-за небольшой щели на боковой поверхности пористого аппликатора бо́льшая часть жидкости проходит через эту щель, что приводит к неравномерному распределению образца на поверхности адсорбента. *В*. Раствор, вытекающий по каплям из трубчатого аппликатора, выбивает в адсорбенте ямку, что приводит к избыточному току жидкости в центре колонки. *Г*. Чтобы избежать ситуации, изображенной на рис. *В*, над поверхностью адсорбента создают большой слой буфера. *Д*. Частицы, содержащиеся в образце, закупоривают поверхность адсорбента. В случае образования небольшой ямки на одной стороне поверхности адсорбента весь поток жидкости может проходить через нее и адсорбция будет неравномерной. Чтобы не допустить этого, образец следует отцентрифугировать или профильтровать перед нанесением на колонку.

жутся на дне, тогда как верхняя часть колонки в основном будет заполнена самыми мелкими частицами. Этот факт сам по себе не имеет особого значения, если не касаться вопроса о воспроизводимости. С другой стороны, взмучивание раствора во время осаждения может привести к неравномерному распределению частиц и, следовательно, будет причиной неравномерной набивки колонки, что повлечет за собой неравномерное протекание раствора во время работы.

В идеальном случае колонку следует заполнять адсорбентом за один прием при постоянном перемешивании суспензии, как показано на рис. 1.11. Короткие колонки удобно заполнять густой суспензией, в которой на 1 объем адсорбента приходится не более 1 объема буфера. При этом частицы быстро оседают благодаря тому, что жидкость свободно вытекает из колонки через открытую выходную трубку. После набивки колонки необходимо пропустить через нее несколько объемов буфера для уравновешивания; это особенно важно при работе с ионообменниками; в этом случае pH суспензии адсорбента в буфере должен быть доведен до нужной величины еще перед набивкой колонки.



Протекание жидкости через колонку может осуществляться под действием силы тяжести; если давление водяного столба высотой около 1 м не дает достаточно быстрого потока, значит, система, вероятно, частично блокирована или используемые трубки слишком тонки и создают большое сопротивление. Широко применяемые перистальтические насосы, с помощью которых можно поддерживать постоянную скорость протекания буфера, позволяют размещать образец, буфер и градиентный смеситель на удобном уровне.

Разделение белков происходит на колонке, и результаты записываются по мере того, как жидкость вытекает из колонки. На рис. 1.12 изображены также регистрирующий УФ-спектрофотометр, измеряющий оптическую плотность при длине волны 280 нм (полоса поглощения Trp+Tyr) или при длинах волн от 220 до 205 нм (полоса поглощения

Рис. 1.11. Идеальный метод заполнения колонки. Суспензия непрерывно перемешивается в резервуаре, находящемся над колонкой, с тем чтобы частицы разных размеров равномерно распределялись по всей длине колонки.

пептидных групп), что обеспечивает бо́льшую чувствительность, и коллектор фракций, собирающий равные объемы жидкости за определенные промежутки времени. Если работать без перистальтического насоса, скорость потока может меняться; в этом случае для получения фракций равного объема более приемлем счет капель. С другой стороны, величина капель меняется вследствие изменения поверхностного натяжения по мере элюции белков. Поток с колонки можно разделить, с тем чтобы отбирать небольшое количество элюата на ферментативный анализ. При правильной синхронизации можно записывать результаты определения ферментативной активности параллельно с кривой элюции белка. Градиентную элюцию можно осуществлять при помощи двух стаканов, соединенных сифоном. Более точные и воспроизводимые градиенты получаются при использовании

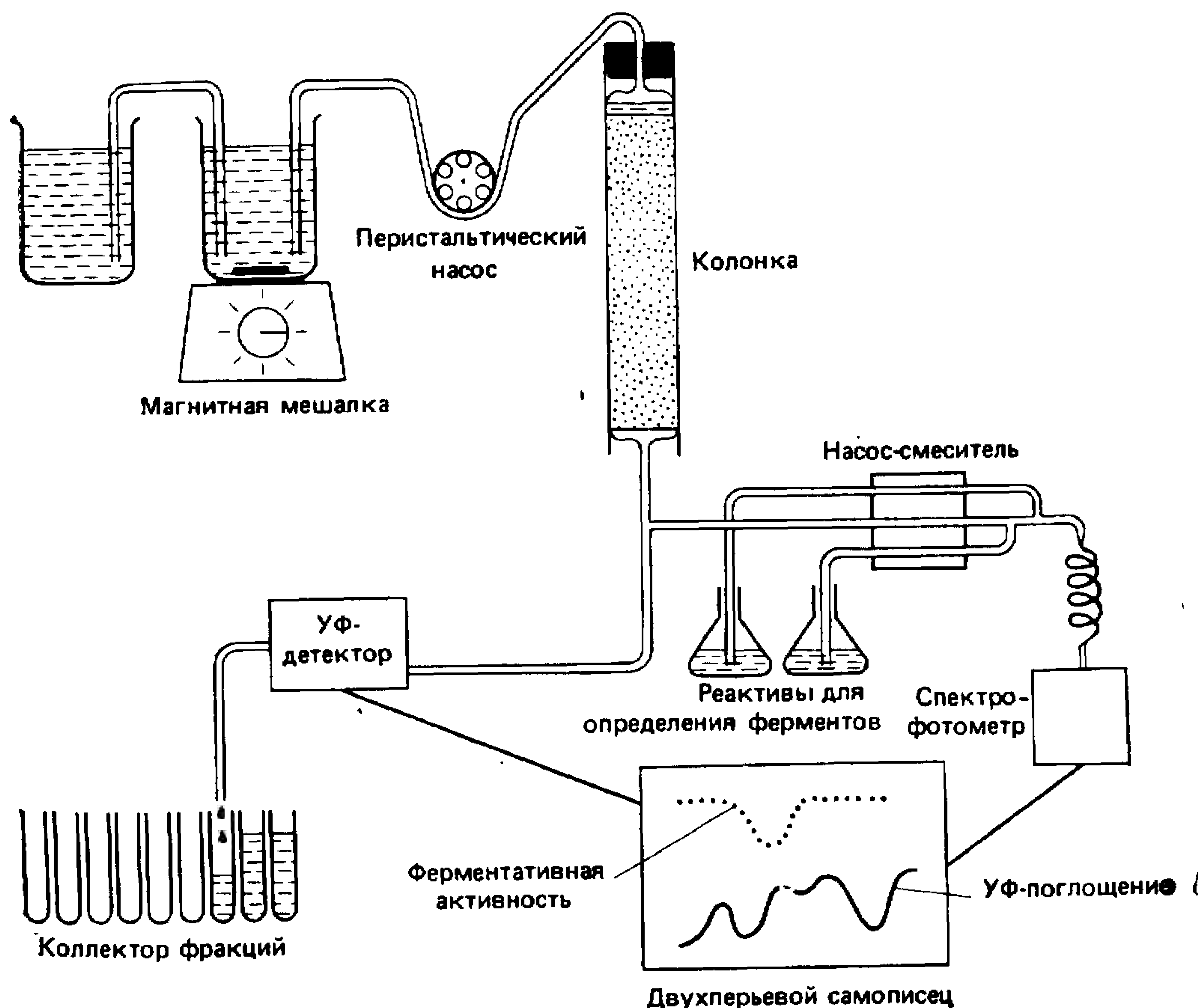


Рис. 1.12. Схема расположения всей системы для колоночной хроматографии, включая автоматический сбор элюата с помощью коллектора фракций и непрерывное измерение ферментативной активности.

двух цилиндров с лопастной мешалкой, соединенных между собой в нижней части (см. рис. 4.19). Наконец, любой градиент можно получить с помощью автоматических систем типа «черного ящика».

1.4. НЕКОТОРЫЕ ПРИЕМЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ РАБОТЕ С БЕЛКОВЫМИ РАСТВОРАМИ

В последнем разделе этой вводной главы, посвященной общим методам, приведены некоторые сведения об обращении с белковыми растворами. В гл. 6 обсуждаются специальные методы, позволяющие сохранять стабильность фермента и его активность. Очень часто в распоряжении исследователя бывает раствор белка, который еще непригоден для фракционирования. Он может быть в неподходящем буфере, иметь не то значение pH, содержать слишком много соли, быть слишком разбавленным или слишком мутным. Мутность указывает на наличие нерастворимых частиц, которые можно отцентрифугировать или отфильтровать, как описано в разд. 1.2. Значение pH можно легко изменить с помощью pH-метра, добавляя к раствору не очень сильную кислоту или щелочь (разд. 6.1). Концентрирование растворов и способы замены буферов описаны в данном разделе более подробно.

Концентрирование

Концентрированные растворы можно легко разбавить, однако обратный процесс ограничивается условиями, налагаемыми вторым законом термодинамики. Концентрировать растворы белков можно по-разному; выбор наилучшего способа зависит от особенностей применения концентрируемого белка и предъявляемых к нему требований. Концентрирование можно проводить путем осаждения белкового раствора с последующим растворением осадка в меньшем объеме. Обычно при этом используют сульфат аммония, хотя иногда применяют и ацетон (разд. 3.4). Растворенный осадок содержит осадитель, который необходимо удалить. Методы осаждения пригодны только для растворов, содержащих белки в концентрации выше 1 мг/мл; белки в более низкой концентрации или не осаждаются, если их растворимость недостаточна низка, или денатурируют в процессе агрегации. Однако из этого последнего правила существует много исключений, так как некоторые белки в разбавленном растворе обладают по сравнению с другими более высокой стабильностью.

Адсорбцию белков, например, на ионообменнике можно использовать для успешного концентрирования их из очень разбавленных растворов (если нужный фермент адсорбируется

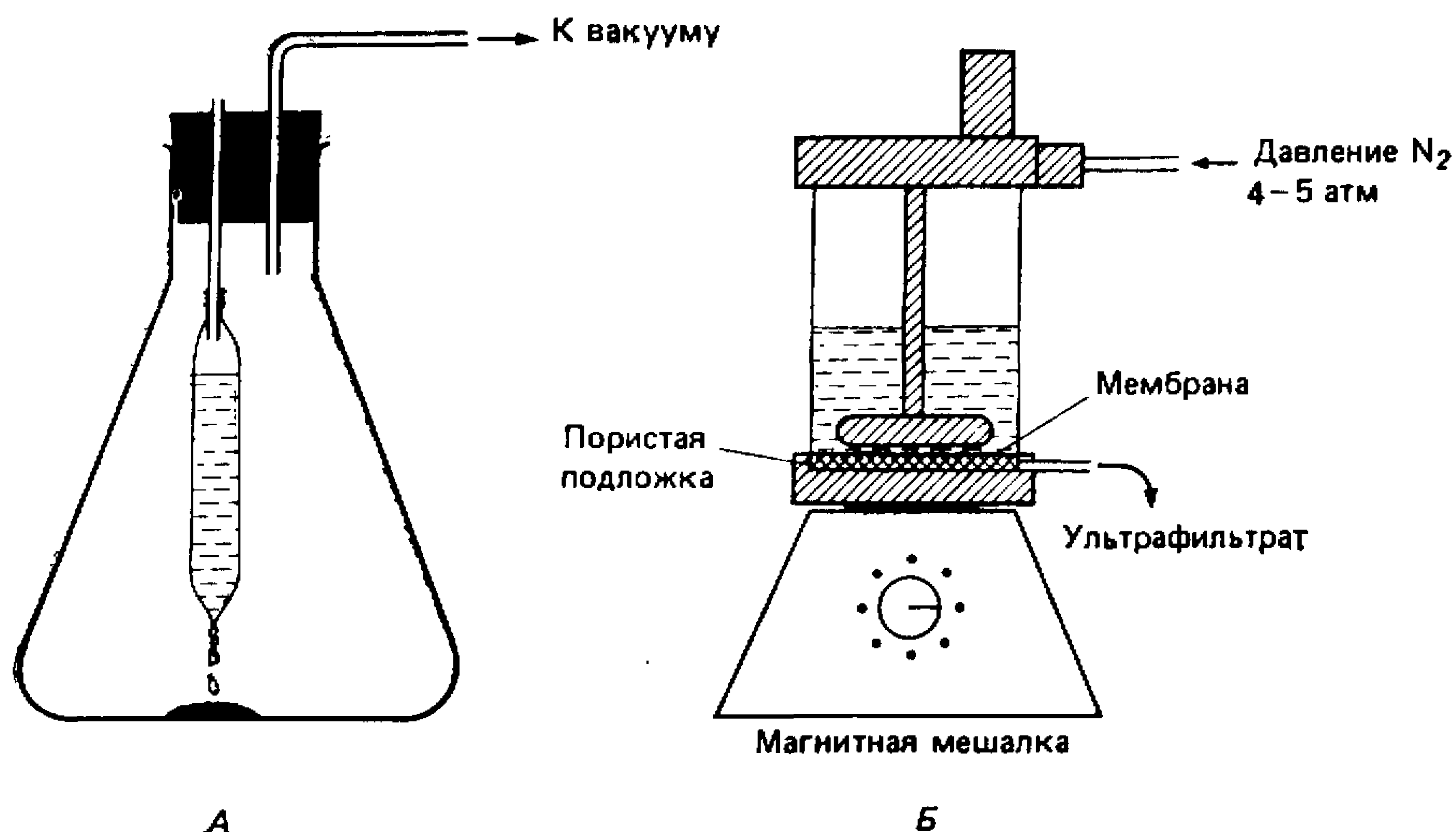


Рис. 1.13. Ультрафильтрация белковых растворов. *А*. Подвешенный диализный мешок сообщается с внешней атмосферой, а в колбе создается вакуум, так что максимальная разность давлений составляет менее 1 атм. *Б*. Ячейка для ультрафильтрации может работать при давлении до 5 атм. Фильтрат продавливается сквозь мембрану.

полностью, неважно, адсорбируются ли при этом другие белки). Например, очень разбавленный белковый раствор, элюированный с ДЭАЭ-целлюлозы при низкой ионной силе и pH 6, можно адсорбировать на маленькой колонке с ДЭАЭ-целлюлозой, повысив pH раствора до 8, а затем элюировать белок небольшим объемом солевого раствора.

Наиболее важные методы концентрирования разбавленных растворов белков заключаются просто в удалении воды и низкомолекулярных веществ. Это может быть достигнуто с помощью различных приемов, основанных на применении полупроницаемых мембран (диализ) или на принципах гель-фильтрации; при этом белки не проходят через мембрану или какую-то поверхность, через которую вода и малые молекулы проходят. Наиболее часто используемой системой является ультрафильтрация, при которой вода принудительно проходит через мембрану, а по другую сторону мембраны остается более концентрированный раствор белка. Это достигается либо снижением давления, чтобы «отсосать» воду (рис. 1.13, *А*), либо, чаще, применением сжатого воздуха или азота при давлении до 5 атм в специальных ячейках с перемешиванием раствора для предотвращения закупорки мембраны (рис. 1.13, *Б*). Последний метод при правильном использовании позволяет снизить объем с 50

до 5 мл или с 200 до 10 мл в течение 1 ч и даже быстрее. Ультрафильтрация особенно эффективна, если конечная концентрация белка остается относительно низкой. Скорость ультрафильтрации очень быстро падает с повышением концентрации белка.

Для быстрого концентрирования можно использовать сухой гель-фильтрующий материал, который при набухании исключает белок. Так как невозможно удалить весь белковый раствор с поверхности частиц без промывания (приводящего к разбавлению), этот метод пригоден лишь в тех случаях, когда более важное значение имеет концентрация раствора, а не выход белка. В лучшем случае можно ожидать, что потери белка составят 10—15%. Например, при обработке 100 мл раствора 20 г сухого сефадекса G-25 порошок быстро набухает и поглощает воду, занимающую практически весь объем геля. После отсасывания набухшего геля получают около 30 мл раствора, содержащего около 80% исходного белка, сконцентрированного приблизительно вдвое. Это весьма удобный метод, если необходимо быстро сконцентрировать уже концентрированный раствор, однако при очистке ферментов он обычно не применяется из-за потерь белка.

Еще один метод концентрирования состоит в удалении воды за счет осмотических сил. Образец помещают в диализный мешок, который затем погружают в раствор или порошок, оттягивающий воду из мешка. Обычно для этого используют полиэтиленгликоль (мол. масса 20 000) или высокозамещенную карбоксиметилцеллюлозу. Оба этих полимера очень сильно поглощают воду, поддерживая низкую активность воды снаружи мешка и высокую внутри. Фирма Calbiochem выпускает эти вещества под названием «Aquacide». Они очень удобны при работе с небольшими объемами: в течение 1 ч раствор объемом 10 мл можно сконцентрировать практически досуха, обсыпая диализный мешок порошком и периодически удаляя с его поверхности гидратированный гель. При работе с большими объемами можно использовать концентрированный раствор полиэтиленгликоля (например, 20%-ный). Диализный мешок оставляют в этом растворе при постоянном перемешивании на несколько часов. Метод можно считать вполне удовлетворительным при условии, что полимеры не содержат низкомолекулярных примесей, вредных для фермента.

Удаление солей; смена буферов

Концентрирование белковых растворов и диализ тесно связаны между собой. Обычно при диализе нежелательные низкомолекулярные вещества удаляются из образца и замещаются

буфером. Осмотические силы действуют в противоположном направлении: под влиянием высокой концентрации соли или органических веществ, присутствующих в образце, вода начинает входить в диализный мешок раньше, чем соль выходит из него; поэтому на первых этапах объем раствора в диализном мешке возрастает, если концентрация растворенных веществ высока. Диализ используют как для удаления избытка низкомолекулярных веществ, так и для одновременного введения нового буферного раствора (а иногда и просто воды) в образец. В продаже имеются диализные трубки самых разных размеров; обычно они не пропускают молекулы крупнее 15 000—20 000 дальтон. Все низкомолекулярные вещества свободно проходят через мембрану, и в результате состав буфера с обеих сторон уравнивается. Без смены буферного раствора, против которого проводится диализ, невозможно полностью удалить из образца эндогенные соли, так как равновесие, существовавшее изначально в диализном мешке, теперь устанавливается между содержимым диализного мешка и буферным раствором в диализате. Если объем буфера в 50 раз больше объема образца,

Таблица 1.1. Схемы проведения диализа для снижения концентрации соли от 1 М до менее чем 1 мМ[1)]

Схема 1	
Диализ против 1 л воды —→увеличение объема до 100 мл; при равновесии концентрация соли равна 95 мМ Смена диализата, еще 1 л воды —→увеличение объема до 110 мл; при равновесии концентрация соли равна 9,3 мМ Смена диализата, еще 1 л воды —→увеличения объема не происходит; при равновесии концентрация соли равна 0,9 мМ	Полное уравновешивание достигается по меньшей мере за 3—5 ч, при менее продолжительном диализе необходимо четыре раза менять диализат
Схема 2	
Диализ против 5 л воды —→увеличение объема до 110 мл; при равновесии концентрация соли равна 20 мМ Смена диализата, еще 5 л воды —→увеличения объема не происходит; при равновесии концентрация соли равна 0,4 мМ	Достаточно одной смены диализата, даже если полное уравновешивание не достигается

[1)] Образец представляет собой белок, растворенный в 50 мл буфера, содержащего 1 М сульфат аммония (растворенный осадок, полученный в результате фракционирования сульфатом аммония).

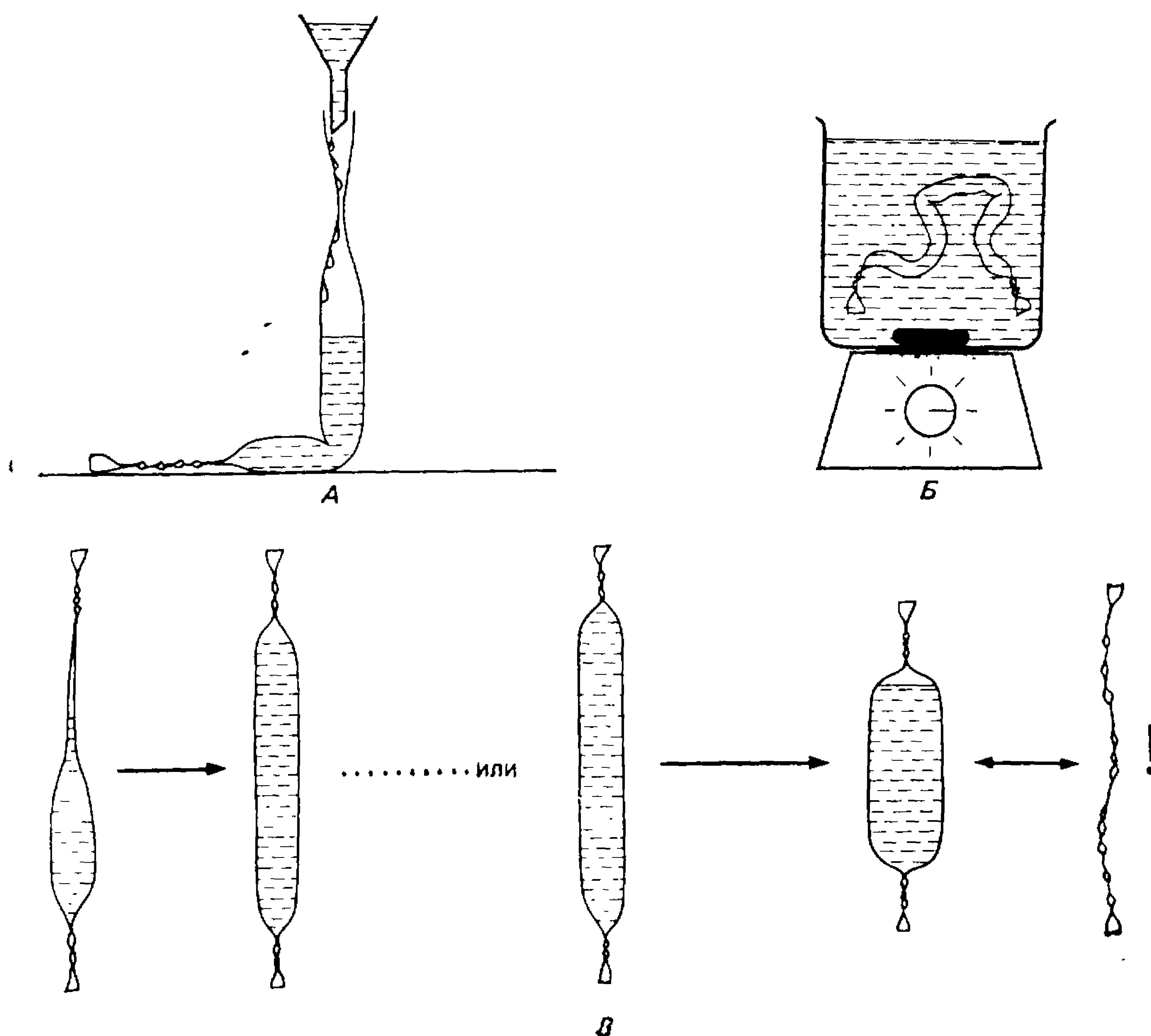


Рис. 1.14. Применение диализного мешка. *А*. Наполнение образцом. *Б*. Перемешивание во время диализа. *В*. Разбухание за счет осмотического давления.

то в лучшем случае можно достигнуть 51-кратного разбавления исходного материала, содержащего соли и другие низкомолекулярные вещества. Следовательно, необходимо хотя бы один раз сменить буфер. Для ускорения процесса следует перемешивать буферный раствор и перемещать в нем диализный мешочек. В хорошо перемешиваемой системе уравновешивание более чем на 90% происходит за 2—3 ч. Лучше использовать большой объем буфера, так как при этом реже придется его менять (табл. 1.1). Если не требуется принимать особых предосторожностей, то диализ удобно проводить в течение ночи; к утру обычно достигается равновесие. Однако во время диализа может происходить протеолитическое расщепление белка (см. раздел 7.1), что ограничивает применение этого метода.

Существуют способы предварительной обработки диализных трубок для удаления из них различных химических веществ, внесенных в процессе производства. Диализные трубки рекомендуется кипятить в растворе ЭДТА—$NaHCO_3$. Длительное хранение их в этом растворе также дает хороший результат. Проблема химического загрязнения белка возникает только тогда, когда нужно провести диализ очень разбавленного белкового раствора, так как в этом случае соотношение между площадью поверхности мембраны и количеством белка будет высоким. Белковые растворы с концентрацией порядка 10 мг·мл$^{-1}$ и более при взаимодействии с мембраной, вероятно, не изменяются; на практике сухие диализные трубки можно спокойно использовать без какой-либо предварительной обработки. После увлажнения трубки на одном ее конце завязывают один или лучше два узла, а в другой конец вставляют воронку, через которую в мешок наливают раствор образца. Его удобно наливать, когда один конец диализного мешка лежит на какой-либо плоскости (рис. 1.14). Лучше всего перед тем, как наливать образец в мешок, положить его на плоскую поверхность так, чтобы через воронку не выходил воздух. Затем мешок завязывают с другого конца и помещают для диализа в буфер. В мешке необходимо оставить свободное пространство в расчете на увеличение объема, если концентрация растворенных в образце веществ высока. В противном случае при увеличении объема раствора мешок набухнет и давление внутри мешка сильно возрастет. Это может привести к разрыву мембраны или вытеканию раствора через узлы.

До широкого внедрения в практику метода гель-фильтрации диализ был рутинной стандартной процедурой, почти всегда применявшейся при очистке белков. Хотя этот метод отличается простотой и не требует сложного оборудования, он имеет два больших недостатка: необходимость замены диализата, причем часто в неудобное время, и относительную длительность процедуры. Вопрос о том, насколько важно проводить все операции достаточно быстро, обсуждается в разд. 7.1. За исключением тех случаев, когда диализ ставят на ночь, т. е. в то время, когда другие работы, как правило, не выполняются, во всех остальных случаях использование гель-фильтрации оказывается предпочтительным. Этим методом достигается быстрое и полное разделение белков, особенно при работе с небольшими объемами.

Принципы, на которых основана гель-фильтрация, хорошо известны, и не стоит описывать их здесь подробно. Удаление солей и замена буфера происходят в соответствии с принципом «все или ничего». Выбранный носитель полностью исключает белки, но удерживает низкомолекулярные вещества. Сефадекс

Таблица 1.2. Размеры колонок для обессоливания белковых растворов с помощью сефадекса G-25

Размеры колонки [площадь поперечного сечения (см²)×высота (см)]	Тип носителя	Объем колонки, см³	Объем образца, см³	Нормальная скорость потока, мл·ч⁻¹	Обычное время завершения процесса (появление белка), мин
1×8	Тонкий	8	1—1,5	40	7
6×10	Средний	60	2—10	200	15
8×30	Средний	240	10—30	250	30
8×60	Средний	480	30—80	250	45
16×90	Грубый	1440	80—300	500	90
50×100	Грубый	5000	300—1000	1500	90

G-25 — это, вероятно, наиболее широко применяемый для данной цели материал. Биогель Р-30 обладает приблизительно теми же свойствами. Быстрое «обессоливание» образца можно осуществить в один прием, пропустив его через колонку, предварительно уравновешенную требуемым буфером. При этом объем образца не должен быть больше $^1/_5$ объема колонки. Хорошее разделение достигается, если скорость элюции составляет не более 50 см/ч (обратите внимание, что 50 см/ч равно 50 мл/ч на 1 см² поперечного сечения). Для того чтобы легко и без задержки проводить обессоливание или замену буфера в образце, необходимо иметь в своем распоряжении ряд заранее подготовленных колонок. В табл. 1.2 дается перечень колонок, которые обычно используются в нашей лаборатории. Чтобы разделение оставалось оптимальным, маленькие колонки следует набивать более мелкодисперсными адсорбентами.

Концентрация солей или белка в образце не должна быть слишком высокой, если требуется оптимальное разделение. Осадок белка, полученный с помощью сульфата аммония, растворяют в минимальном объеме буфера, а перед обессоливанием на колонке этот раствор следует развести буфером по крайней мере в два раза; концентрация белка в растворе должна быть не выше 30 мг/мл. Белок, выходящий из колонки, если он не окрашен и не регистрируется непрерывно на УФ-мониторе, может быть определен с помощью теста с трихлоруксусной или надхлорной кислотой. Присутствие сульфата аммония можно выявить в пробе с хлоридом бария (если буфер колонки содержит фосфат, используйте хлорид бария в HCl, чтобы не спутать осадок сульфата бария с осадком фосфата бария). Помните, что колонка для гель-фильтрации должна быть предварительно уравновешена буфером, который будет замещен белком. Объем буфера, которым уравновешивают колонку перед нанесени-

ем образца, должен быть по крайней мере равен объему колонки. Однако не имеет значения, каким буфером промывают колонку, так как белок двигается перед фронтом растворителя. При использовании дорогих буферов колонку можно уравновешивать «обессоливающим» буфером, например очень разбавленным буфером трис — ЭДТА. Для его приготовления раствор кислой формы ЭДТА (~0,2 мМ) нейтрализуют трисом до pH 7,5—8. Такой буфер не оказывает вредного воздействия на белки, за исключением тех случаев, когда: а) ЭДТА инактивирует их, связывая незаменимый ион металла, или б) белки «всаливаются» (разд. 3.1) при очень низкой ионной силе и осаждаются в колонке. При условии что этого не происходит, состав буфера в выходящем из колонки растворе белка можно довести до нормального, добавив к нему, например, 0,11 объема концентрированного (10×) буферного раствора.

Как и в случае диализа, конечный объем белкового раствора, вероятно, будет значительно больше, чем до «обессоливания»; тем не менее перед нанесением образца на адсорбционную колонку может потребоваться дальнейшее разведение (гл. 4). Смена буферов может быть осуществлена тем же способом, что и «обессоливание»; однако, если концентрация белка в растворе низка и объем достаточно велик, лучше предварительно провести «высаливание» белка, а затем растворить его в небольшом объеме буфера и обессолить на небольшой колонке.

В этой главе описаны основные приемы, используемые при очистке ферментов. В гл. 3, 4 и 5 подробно рассматриваются методы фракционирования, применяемые для выделения ферментов. Но прежде чем приступить к дальнейшей работе, необходимо приготовить экстракт исходного материала; получение этого экстракта описывается в следующей главе.

ГЛАВА 2

ПРИГОТОВЛЕНИЕ ЭКСТРАКТА

2.1. ИСХОДНЫЙ МАТЕРИАЛ

Для многих исследователей, занимающихся очисткой ферментов, бóльшая часть этого раздела будет малоинтересна, так как им не приходится выбирать исходный материал. Причины этого могут быть самые различные — например, лаборатория может работать только с каким-то одним органом или видом и единственной заботой в этом случае будет обеспечение достаточного количества сырья в нужное время и сохранение его в замороженном виде перед использованием.

В некоторых случаях исследователь имеет возможность выбирать ткань, из которой он будет выделять фермент, либо он может работать с определенной тканью или органом, выбирая по своему усмотрению вид организма. При выборе организмов того или иного вида, используемых для выделения ферментов, руководствуются преимущественно легкостью их выращивания. Из животных наиболее широко используются крыса (особенно при работе с печенью) и кролик (при работе со скелетными мышцами).

Если работа проводится с органами, размеры которых слишком малы у лабораторных животных (сердце, мозг, почки, тимус), то используется мясной скот, в основном быки и свиньи. Кроме того, не следует забывать, что человек — это тоже животное, и именно ради него приносят в жертву такое множество лабораторных животных; при этом исходят из предположения, что то, что справедливо для крысы, вероятно, справедливо и для человека. Изучение ферментов тканей человека ограниченно по понятным причинам. С другой стороны, человеческая кровь вполне доступна, и существует множество методов выделения ферментов из эритроцитов и других клеток крови. Плазма крови бедна ферментами, но содержит значительные количества неферментных белков. В последнее время изучение ферментов из различных видов стало более обычным. Частично это обусловлено уяснением того, что многие важные особенности метаболического контроля, локализации ферментов и другие их характеристики значительно различаются даже в пределах типа позвоночных.

Ферментам беспозвоночных уделяют довольно мало внимания в основном из-за того, что в большинстве своем беспозвоночные животные очень малы и для получения необходимого количества исходного материала приходится использовать много особей. Если нужный орган не извлекают из каждой особи (трудная задача при работе с насекомыми), то очистка гомогената, приготовленного из целого тела, осложняется тем, что в нем содержится большое количество пищеварительного сока с протеолитическими ферментами, которые также высвобождаются в экстракт. Бóльшая часть хорошо известных ферментов беспозвоночных получена из крупных ракообразных, таких, как речной рак и краб.

Долгое время биохимия растений была очень слабо связана с биохимией животных, главным образом из-за того, что последняя имеет медицинскую направленность, а также потому, что при работе с растениями перед энзимологом встают определенные трудности. Качественные различия, связанные с сезонностью, могут быть преодолены, если выращивать растения в специальных камерах; в противном случае приходится мириться с вариабельностью материала, выращенного под открытым небом. В силу очевидных причин из огромного множества видов для изучения используются в основном те, которые имеют экономическое значение, но, с точки зрения биохимика, это не всегда наилучший выбор. Тем не менее работают преимущественно на одном или двух видах растений вследствие того, что из их листьев можно без особого труда приготовить экстракты, а из них легко выделить хлоропласты. Наиболее часто используются шпинат *Spinacia oleracea* и в какой-то мере родственная ему свекла *Beta vulgaris,* которые хорошо растут в различных климатических условиях. Растительные клетки имеют множество компартментов (отсеков); в большинстве случаев основной объем клетки занимает вакуоль, заполненная весьма кислыми растворами, протеазами и целым рядом других, вредных для цитоплазмы веществ. Значительная часть цитоплазмы приходится на хлоропласты, гранулы крахмала и другие органеллы; в клетке имеется также объемистая клеточная стенка (целлюлоза). Цитоплазма (которая вместе с хлоропластами содержит бóльшую часть ферментов) часто может составлять не более 1—2% всего объема растительной клетки. Следовательно, растительные экстракты содержат очень мало белка, даже если при их приготовлении добавляют минимальное количество жидкости.

При работе с микроорганизмами возникают другие проблемы. Животный материал можно получать на местной скотобойне или из институтского вивария, растительное сырье можно приобрести на рынке, а микроорганизмы (за исключением

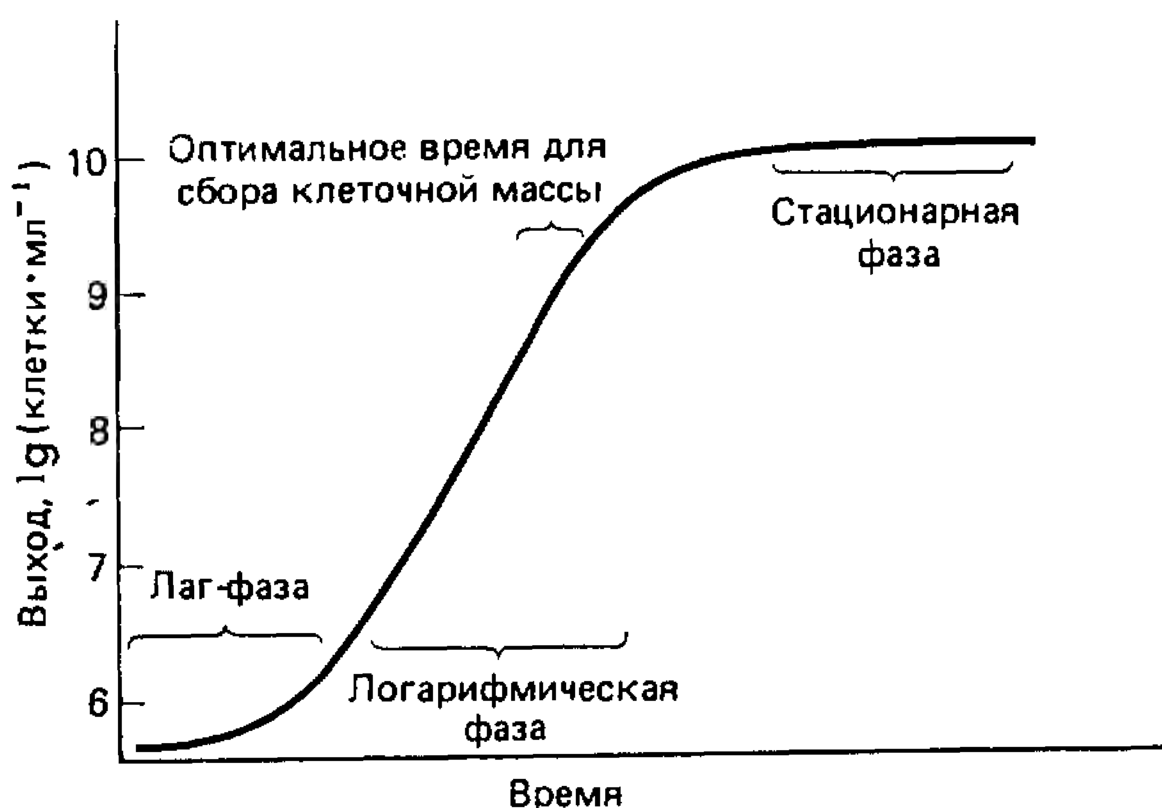


Рис. 2.1. Рост микроорганизмов на богатой питательной среде. Конец логарифмической фазы перед замедлением роста клеток является оптимальным периодом сбора клеточной массы, дающим самый высокий выход.

дрожжей) необходимо специально выращивать в определенных условиях и в довольно больших количествах. Для каждой из таких групп микроорганизмов, как водоросли, грибы, дрожжи и бактерии, требуются особые условия выращивания, сбора клеток и экстрагирования. Особой проблемой, требующей тщательного изучения, является значительное изменение ферментного состава в различные фазы роста клеток. Желательно производить сбор бактериальных клеток и других одноклеточных микроорганизмов в течение логарифмической фазы роста (рис. 2.1), хотя активность изучаемого фермента может и не быть максимальной в этот период. Следует проводить предварительные исследования организма с целью определения физиологического состояния, при котором содержание нужного фермента наибольшее.

Saccharomyces cerevisiae, пекарские дрожжи, доступны в больших количествах, так что если их можно использовать, то проблема сырья решена. Прессованные дрожжи, поступающие в продажу, в конце фазы роста состоят практически на 100% из дрожжевых клеток. Выращивание дрожжей производят на различных питательных веществах. Основным источником углерода для них служит меласса или какой-либо другой источник сахарозы. При 0 °C дрожжи остаются жизнеспособными (и, следовательно, ферменты сохраняют активность) в течение нескольких недель, а при хранении в замороженном виде их можно использовать и через несколько месяцев. В хлебопекарной промышленности и у биохимиков большой популярностью пользуются сухие дрожжи, жизнеспособность которых восстанавли-

вается при добавлении к ним воды. Они служат очень удобным источником многих ферментов, хотя в процессе сушки активность некоторых, наиболее чувствительных, ферментов может несколько снижаться. При хранении в вакууме или в атмосфере азота при 0—4 °С их можно использовать даже через несколько лет. Дрожжи — это, пожалуй, наиболее удобное сырье, при условии что удается разрушить клетки (см. ниже).

Истинный энзимолог редко интересуется проблемой сырья; единственное, что ему нужно, — это выделить как можно больше фермента из наиболее удобного источника. В этом случае необходимо изучить литературу и выбрать лучший объект, с которым можно работать. При сравнении результатов, полученных в разных лабораториях, порой стóит самому провести несколько экспериментальных измерений. Очень важно убедиться в том, что фермент, присутствующий в исходном материале, экстрагируется из него полностью, для того чтобы можно было достоверно определить его содержание в ткани. При неполном разрушении клеток можно недооценить данный объект как источник ферментов из-за того, что значительная часть ферментативной активности не выходит в раствор, а удаляется вместе с осадком во время получения экстракта. Если фермент выделяют из бактериального материала, то экспериментатор должен учитывать возможность отбора штаммов с аномально высоким уровнем ферментативной активности. Это можно сделать либо путем обычного отбора мутантов, либо используя более сложную технику клонирования, посредством которой множественные копии гена фермента включаются в бактериальный геном с помощью плазмид [1]. Экспрессия гена может быть еще более усилена за счет его слияния с сильным промотором [2]. Эта работа занимает много времени, и выполнить ее может только опытный специалист; не стоит даже пытаться применять эти методы, если на выделение фермента отведено мало времени.

Свежесть сырья и его хранение

Обычно чем быстрее используется сырье, тем лучше, т. е. препарат получается более соответствующим нормальному физиологическому состоянию, так как, если ткань некоторое время была «мертва», начинаются естественные процессы разложения. Однако бывают случаи, когда абсолютная свежесть может быть помехой. Например, в скелетных мышцах содержится большое количество АТР. В присутствии фосфокреатина и гликогена высокая концентрация АТР сохраняется в течение нескольких часов и после смерти. Структурные белки миозин и актин в норме нерастворимы при ионной силе ниже 0,25, но в присутст-

вии ATP разорванные миофибриллы набухают и часть белков переходит в раствор. Даже при физиологической ионной силе (~0,16) некоторое количество миозина может перейти в растворимое состояние. Впоследствии это может сказаться на качестве ферментных препаратов, так как миозин осаждается и смешивается с фракциями, в которых он не должен присутствовать. Примером особого рода служит получение препарата AMP-дезаминазы [3]. При экстракции совсем свежих мышц буфером с рекомендуемой ионной силой 0,25 в раствор переходит много актина и миозина, что мешает следующему этапу — адсорбции на фосфоцеллюлозе. Препарат лучшего качества можно получить, если мышцам сначала дать возможность перейти в состояние окоченения, что сопровождается потерей ATP. Однако это редко встречающийся случай. Обычно все же следует работать на свежем материале.

Возможность получить свежий материал не всегда совпадает с возможностью использовать его. Как полученный материал, так и экстракт из него следует хранить замороженными. В процессе замораживания происходит множество событий. Прежде всего замерзает свободная вода и образуются кристаллы льда. Кристаллы льда разрушают мембраны и органеллы, но не повреждают непосредственно ферменты. По мере приближения температуры к точке эвтектики для различных солей, присутствующих в растворе, эти соли кристаллизуются. Наименее растворимая соль из пары, входящей в состав буфера, первой выпадает из раствора, вследствие чего значение pH может значительно измениться еще до того, как раствор полностью замерзает [4, 5]. Если хранение происходит при температуре от —15 до —25 °С (обычная температура для испарителей в бытовых холодильниках и простых морозильников), то значение pH оставшегося незамороженным концентрированного раствора будет отличаться от значения pH исходного раствора. В таком концентрированном белковом растворе протеазы, освободившиеся из лизосом в процессе замораживания, могут начать функционировать (хотя и медленно при такой низкой температуре), и хранение материала в течение нескольких недель может сильно ухудшить его качество. Таким образом, при замораживании следует очень быстро снижать температуру до —25 °С и хранить материал, если возможно, даже при более низкой температуре. Коммерческие морозильники дают температуру до —80 °С.

Иногда лучше замораживать экстракт, так как его состав можно менять в целях достижения оптимальных условий хранения. После получения экстракта к нему можно добавить ингибиторы протеолитических ферментов (разд. 6.2) и довести его pH подходящим буфером до значения, при котором ферменты

стабильны. Кроме того, экстракт можно получить из большого количества материала, так что образцы, взятые впоследствии из морозильника, будут различаться лишь временем хранения. Различия в их свойствах в этом случае не будут обусловлены биологическими различиями замороженного материала.

Следует помнить, что очень важна скорость оттаивания: чем она выше, тем лучше (при условии, что не происходит местного перегрева). Лучше всего погружать контейнер в теплую воду (40—50 °С) и почаще его встряхивать. По всей вероятности, в этих условиях температура оттаявшего раствора не будет подниматься выше 10 °С до тех пор, пока не растает весь лед.

Теперь, когда мы располагаем свежим или оттаявшим материалом, можно приступить к гомогенизации и приготовлению экстракта, содержащего фермент в растворе. В большинстве случаев это первый этап очистки ферментов. Выделение субклеточных частиц или другого нерастворимого материала, которое проводят перед тем, как перевести фермент в раствор, кратко описано ниже (разд. 2.4).

2.2. РАЗРУШЕНИЕ КЛЕТОК И ЭКСТРАКЦИЯ

Бóльшая часть белков и ферментов, изученных в ранний период истории белковой химии, была выделена из внеклеточных жидкостей. Причина этого заключается не только в легкости получения материала, но и в том, что внеклеточные белки в основном более стабильны часто благодаря наличию в них дисульфидных мостиков, а также небольшим размерам молекул. Первоначально исследования структуры белков, естественно, сосредоточивались на этих небольших белках. Так, лизоцим, рибонуклеаза и химотрипсин были самыми первыми детально изученными белками, и все они получены из внеклеточных источников. Однако большинство ферментов локализовано внутри клеток. Часто такие белки менее стабильны — у них обычно отсутствуют дисульфидные связи вследствие того, что внутриклеточная среда обладает восстанавливающими свойствами. Цель данного раздела — дать описание методов разрушения клеток и выделения ферментов в водный «экстракт», что является первым этапом очистки ферментов.

Существует множество методов разрушения клеток, что обусловлено разнообразием типов клеток. Большинство клеток имеют присущие только им особенности, которые следует учитывать при их разрушении. Животные ткани широко варьируют по своей прочности: наряду с легко разрушаемыми эритроцитами используется и жесткий коллагенсодержащий материал, встречающийся в кровеносных сосудах и других тканях, содер-

Таблица 2.1. Способы разрушения клеток

Способ	Пример	Принцип
Мягкое воздействие		
Лизис клеток	Эритроциты	Осмотическое разрушение клеточной мембраны
Разрушение под действием ферментов	Обработка бактерий лизоцимом	Разрушение клеточной стенки приводит к осмотическому разрыву клеточной мембраны
Химическая солюбилизация и автолиз	Экстракция дрожжей толуолом	Клеточная стенка (мембрана) частично растворяется под действием химических веществ, освободившиеся при этом литические ферменты завершают процесс
Гомогенизация вручную	Ткань печени	Клетки продавливают через узкий зазор, что приводит к разрушению клеточной мембраны
Размельчение (растирание)	Мышечная ткань и др.	Клетки разрушаются в процессе размельчения ткани под действием силы сдвига
Воздействие средней силы		
Лопастной гомогенизатор (типа Уоринга)	Мышечная ткань, большинство животных тканей, растительные ткани	Происходит механическое разрушение крупных клеток и отделение друг от друга мелких
Растирание с абразивом (например, с песком или окисью алюминия)	Растительные ткани, бактерии	Разрушение клеточных стенок происходит благодаря наличию на частицах абразива микрошероховатостей
Сильное воздействие		
Пресс Френча	Бактерии, растительные клетки	Клетки продавливают через маленькое отверстие под очень большим давлением; они разрушаются под действием силы сдвига
Ультразвук	Суспензии клеток	Ультразвуковые волны создают высокий локальный градиент давления; в результате клетки разрушаются под действием напряжения сдвига и кавитации
Шаровая мельница	Суспензии клеток	Разрушение клеточной стенки происходит под действием быстрой вибрации стеклянных шариков
Гомогенизатор Мэнтона — Гаулина	Суспензии клеток	Действует так же, как и пресс Френча, но позволяет обрабатывать большие количества материала

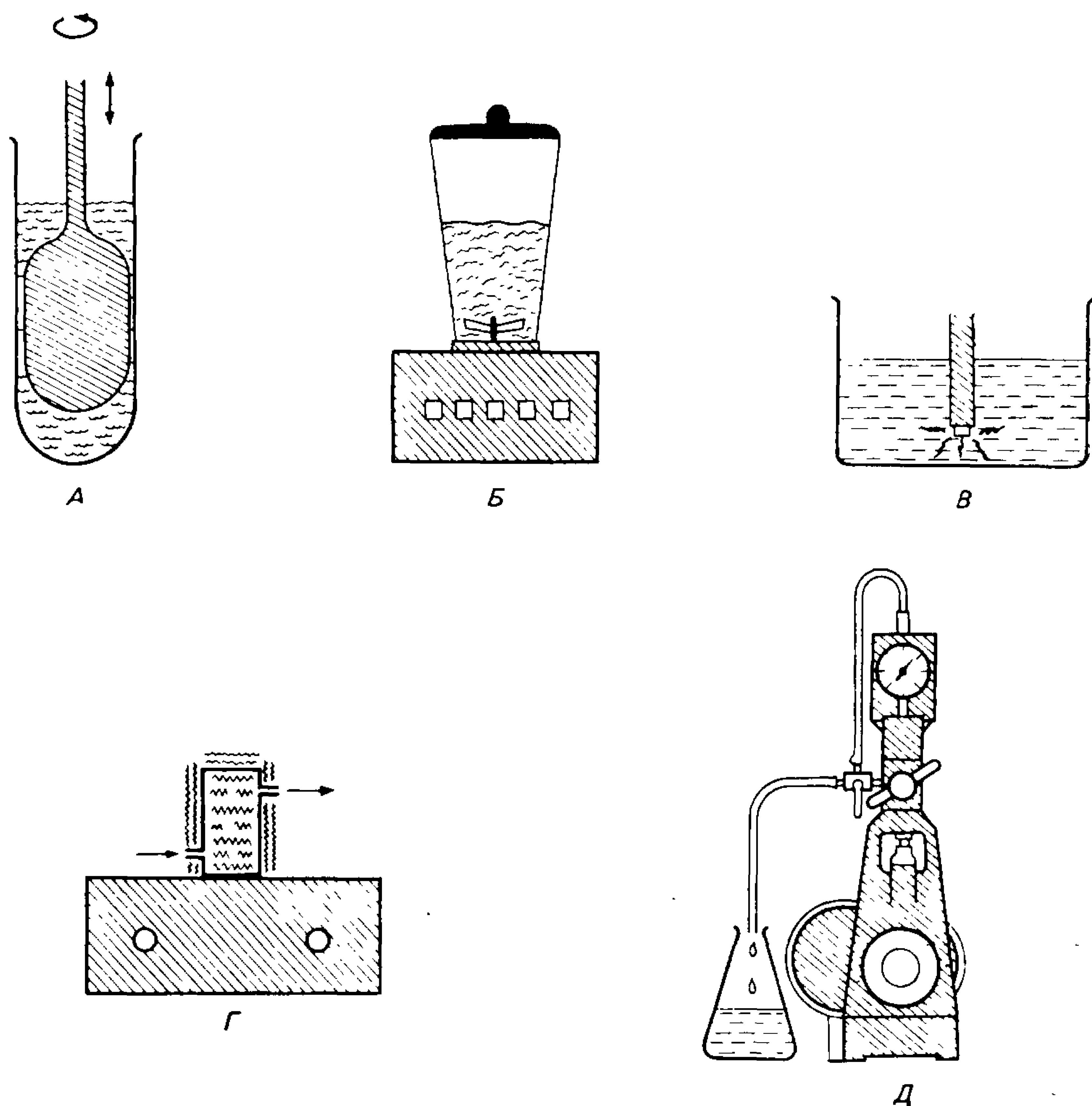


Рис. 2.2. Оборудование, используемое для разрушения клеток при получении экстракта. *А*. Ручной или механический стеклянный гомогенизатор. *Б*. Лопастной смеситель (бытовой миксер). *В*. Ультразвуковой гомогенизатор. *Г*. Вибрационная шаровая мельница. *Д*. Клеточный дезинтегратор Мэнтона — Гаулина.

жащих гладкие мышцы. Растительные клетки обычно труднее разрушаются, чем животные, из-за наличия у них целлюлозной оболочки. Среди бактерий есть и довольно хрупкие организмы, которые могут быть разрушены пищеварительными ферментами или просто под действием осмотического шока, и более устойчивые, с толстой клеточной стенкой; для разрушения последних необходимо сильное механическое воздействие, которое, однако, не должно быть чрезмерным, так как при этом могут инактивироваться лабильные ферменты. В табл. 2.1 приводится перечень используемых методик, иллюстрации к которым даны на рис. 2.2.

Эти методы служат для разрушения клеток и выделения ферментов в раствор. Если фермент локализован в органеллах, метод может быть использован только при условии, что органеллы также разрушаются. С другой стороны, может понадобиться предварительное выделение самих органелл, что позволит избавиться от загрязнения цитоплазматическими ферментами перед экстракцией фермента из органелл. Для этого требуется менее сильное воздействие. Предварительное растворение поверхностных коллагеновых и целлюлозных структур препаратами гидролитических ферментов позволяет в дальнейшем разрушать клетки более мягкими способами, сохраняя целостность органелл. Примером подобной методики служит получение препаратов митохондрий из таких тканей, как скелетная или сердечная мышцы, под действием протеолитических ферментов [6]. Однако эта методика применима только для получения препаратов в небольших масштабах и больше подходит для метаболических исследований органелл, чем для очистки ферментов. Выход очищенных органелл может быть очень низким, поэтому во многих случаях лучше сначала разрушить всю ткань, а затем уже приступить к выделению нужного фермента из сложной смеси белков в экстракте. Таким образом, ферменты митохондрий и хлоропластов часто получают из тканевого гомогената, а не из выделенных органелл.

Наконец, фермент может быть нерастворим в буфере, используемом для экстракции. В этом случае необходим специальный подход, который кратко рассматривается в разд. 2.4.

После разрушения клеток и осаждения нерастворимого материала центрифугированием получают «экстракт». Смесь до центрифугирования обычно называют гомогенатом. После центрифугирования в жидкой фазе должна находиться по возможности бóльшая часть фермента, присутствовавшего в исходном материале. Часть жидкости удерживается осадком, и общие потери будут пропорциональны отношению объема осадка к объему жидкой фазы. При получении экстракта потери за счет удерживания жидкости осадком не должны составлять более 20%, если только сырье не очень легко доступно, и высокая концентрация фермента при малом объеме экстракта не является более важным условием, чем полное выделение фермента из гомогената. Если объем жидкости, удерживаемой осадком, составляет половину объема осадка, то отсюда можно подсчитать, что для выделения 80% фермента необходимо, чтобы объем надосадочной жидкости в два раза превышал объем осадка. Большинство животных тканей содержит значительное количество нерастворимого клеточного материала, который связывает много воды. При работе с ними объем осадка получается практически равным исходному объему ткани (в некоторой

мере это зависит от условий центрифугирования). Таким образом, когда получают гомогенат, скажем, из печени, необходимо добавить *по крайней мере* два объема подходящего экстрагирующего буфера. Чем больше буфера будет добавлено, тем бо́льшая часть растворимой фракции экстрагируется, но экстракт будет более разбавленным; его большой объем может создать трудности в дальнейшей работе. Для приготовления гомогенатов из печени, сердца и скелетных мышц обычно добавляют 2,5 объема экстрагирующего буфера.

Растительные ткани значительно отличаются от животных. Как указывалось в предыдущем разделе, внутриклеточное содержимое составляет лишь малую часть объема растительной ткани. Наличие больших вакуолей (рассматриваемых здесь как внеклеточные образования) и межклетников служит причиной высвобождения большого количества жидкости при разрушении ткани. В этом случае практически не требуется добавления экстрагирующей жидкости. Объем осадка после центрифугирования может составлять только 20—40% объема исходной растительной ткани. Тем не менее использование дополнительного экстрагирующего раствора может быть очень важно для контролирования нежелательных процессов, происходящих во время гомогенизации. Такими процессами могут быть подкисление среды или окисление нестойких соединений. Особую проблему представляют растения, содержащие фенольные соединения, которые окисляются в основном под действием эндогенных фенолоксидаз с образованием темных пигментов. Эти пигменты ковалентно соединяются с белками и инактивируют многие ферменты. Пригодны два способа решения этой проблемы. Во-первых, добавление какого-либо тиолового соединения, например β-меркаптоэтанола, сводящего до минимума действие фенолоксидаз. Во-вторых, часто оказывается полезным добавление порошкообразного поливинилпирролидона, адсорбирующего фенольные соединения.

По объему осадка, получаемому после центрифугирования, микроорганизмы больше похожи на животные ткани. Дрожжи и сходные с ними грибы с толстой клеточной стенкой дают осадок, объем которого практически равен исходному объему клеточного материала. То же самое характерно и для бактерий. Если в процессе экстракции действуют значительные силы сдвига, в раствор может перейти большое количество материала клеточной стенки. Это создает новые проблемы, которые будут обсуждаться далее (разд. 2.3).

Обломки клеток легко отцентрифугировать. Это особенно относится к крупным обломкам животных и растительных тканей. Однако после центрифугирования, например, при 10 000 *g* в течение 15 мин в суспензии остаются внутриклеточные части-

цы. Мутность полученного раствора не имеет существенного значения, так как ее можно устранить на этапах фракционирования. Использование более мощных устройств для разрушения клеток, таких, как шаровая мельница, дает возможность разрушать клеточные стенки до мельчайших частиц относительно низкой плотности, обусловленной тем, что в них обычно содержатся липиды. Такие частицы трудно осаждаются при доступных для больших объемов величинах *g*, и экстракт может остаться очень мутным. Методы осветления экстракта описаны ниже (разд. 2.3).

Далее в общих чертах описываются процедуры получения экстрактов из различных тканей.

Ткани животных

Ткань разрезают на кусочки, удаляют, насколько это возможно, соединительную ткань и жир. Разрезанную ткань помещают в лопастной гомогенизатор, добавляют 2—3 объема холодного экстрагирующего буфера в расчете на 1 г ткани. Смесь гомогенизируют в течение 30 с; гомогенизацию повторяют, если остались куски неразрушенной ткани. При доведении pH до нужного значения перемешивают гомогенат 10—15 мин, а затем переносят его в центрифужные пробирки. Центрифугируют при 5000—10 000 *g* в течение 60 мин ($2\cdot10^5$—$3\cdot10^5$ *g*·мин). Экстракт сливают через фильтр «Miracloth» (Chicopee Mills, Inc., N. J.), марлю или стеклянную вату для удаления частиц жира.

Эритроциты

Экстракт можно легко получить из осажденных центрифугированием эритроцитов после промывания их изотоническим раствором NaCl (0,9%, 0,15 М) и повторного центрифугирования. Клетки разрушают осмотическим шоком в воде (2 объема воды на 1 объем отцентрифугированных клеток). Однако около 90% белка, переходящего в раствор, составляет гемоглобин, и если вы занимаетесь очисткой другого белка, то очень полезно применить метод селективного удаления гемоглобина. Для денатурации гемоглобина успешно применяется смесь этанол — хлороформ [7].

Мягкие растительные ткани

К растительной ткани добавляют только 0,5—1 объем холодного буфера, содержащего 20—30 mM меркаптоэтанола и гомогенизируют в течение 30 с. Вместо этого можно пропустить

материал через бытовую соковыжималку, предварительно промытую буфером. Гомогенат следует отцентрифугировать как можно скорее, чтобы уменьшить его потемнение в результате окисления ($2 \cdot 10^5$—$3 \cdot 10^5$ *g*·мин). Жидкость осторожно сливают с поверхности осадка. Для адсорбции фенолов полезно добавить порошкообразный поливинилпирролидон.

Дрожжи

1. Полностью разрушить клетки можно с помощью гомогенизатора Мэнтона—Гаулина (Gaulin Corp. Mass.) или мельницы «Vibrogen Cell Mill» (Bühler, Tübingen), используя около двух объемов буфера на 1 г сырой массы.

2. *Автолиз толуолом.* Применяют различные методы с использованием толуола [8—10]; однако не все они пригодны для работы с коммерческими дрожжами. В основе этих методов лежит обработка дрожжей толуолом, обычно при температуре 35—40 °С. Через 20—30 мин дрожжи «разжижаются» вследствие экстракции компонентов клеточной стенки. После этого к дрожжам добавляют буфер и перемешивают их в течение нескольких часов или оставляют на ночь на холоде. Так как метод автолитический и структуры клеточной стенки разрушаются под действием ферментов, во время обработки может произойти деградация некоторых клеточных ферментов. Вместо толуола можно использовать этилацетат [11, 12], но он не годится для работы со штаммами дрожжей, имеющими более прочные клеточные стенки.

3. *Цитолиз аммиаком* [13]. Этот метод более всего подходит для работы с сухими дрожжами; он прост, но некоторые ферменты, не обладающие устойчивостью при рН 10, могут быть полностью утрачены. «Активные сухие» дрожжи размешивают в 0,5 М растворе NH_4OH (2 объема раствора на 1 г сухого веса) в течение 16—20 ч при комнатной температуре. Введение небольшого количества толуола (5—10% от общего объема) иногда способствует растворению белков. Затем добавляют 1—2 объема воды и необходимое количество уксусной кислоты, чтобы снизить рН до нужного значения. После этого центрифугированием удаляют обломки разрушенных клеток.

Бактерии

Бактериальные клетки можно разрушить ультразвуком, с помощью шаровой мельницы или пресса Френча, хотя не все эти способы удобны для приготовления больших объемов экстракта. В случае небольших объемов клетки можно растирать с окисью алюминия. Грамположительные бактерии обычно чувствительны к лизоциму. Для высвобождения компонентов ци-

топлазмы бывает достаточно 15-минутного перемешивания суспензии клеток в буфере, содержащем 0,2 мг/мл лизоцима яичного белка, при 37 °С. Обработка полученного экстракта дезоксирибонуклеазой I (10 мкг/мл) улучшает его качество, так как при этом вязкость жидкости уменьшается.

Грамотрицательные бактерии, если их предварительно не обрабатывать, менее чувствительны к лизоциму. Недавно описан способ комбинированной обработки клеток неионным детергентом, осмотическим шоком и лизоцимом [14]. Модификацию этого метода используют при экстракции грамотрицательных микроорганизмов *Zymomonas mobilis* и *Photobacterium phosphoreum*. При этом достигается исчерпывающая экстракция ферментов, хотя полного диспергирования клеточной стенки не происходит.

К 10 г сухой клеточной массы, добавляют 0,1 мл 10%-ного (по объему) раствора тритона Х-100, 10 мкл меркаптоэтанола и 2,5 мл глицерина. Клетки диспергируют и энергично размешивают в течение 30 мин. Затем быстро добавляют 30 мл экстрагирующего буфера (например, 20 мМ KP_i, pH 7,0+1 мМ ЭДТА), содержащего 0,2 мг/мл лизоцима и 10 мкг/мл дезоксирибонуклеазы, и продолжают перемешивание еще 30 мин. К смеси добавляют 5 мг фенилметилсульфонилфторида, растворенного в 0,5 мл ацетона, и 0,1 мг пепстатина А, после чего суспензию центрифугируют (15 000 *g* в течение 20 мин).

Здесь приведено лишь несколько примеров процедур, используемых для получения экстрактов из различных источников. На практике чаще пользуются опубликованной методикой, но следует помнить, что применяемое сырье так же, как и оборудование, может значительно отличаться от описанных в методике, поэтому иногда возникает необходимость приспособить метод к определенным условиям.

Таким образом, в основе методов экстрагирования лежит размельчение материала в соответствующем буфере с последующим центрифугированием смеси для удаления нерастворимых остатков.

В следующем разделе описано, как можно улучшить качество экстракта, служащего исходным материалом для очистки фермента.

2.3. ОПТИМИЗАЦИЯ И ОСВЕТЛЕНИЕ ЭКСТРАКТА

На этом этапе можно считать, что найден удовлетворительный метод разрушения клеток и получен экстракт. Чтобы иметь воспроизводимые результаты, важно получать по возможности

идентичные экстракты. Часто поведение белков при фракционировании зависит не только от их особенностей, но и от состава раствора, в который входят также и другие белки. Неудачи могут быть связаны с неоптимальными условиями гомогенизации (низким давлением в ячейке пресса, износом шариков в шаровой мельнице, затуплением лопастей гомогенизатора), что приводит к неполному разрушению клеток. В результате экстракт может быть более разбавленным и состав его будет другим, так как при неполном разрушении клеток не все компоненты переходят в раствор. Для оценки данного экстракта важно точно знать содержание фермента в одном грамме исходного материала. Пожалуй, лучше всего сначала получить экстракт из небольшого количества исходного материала, используя большой объем экстрагирующего буфера (скажем, 10 мл/г), и последовательно определять активность фермента через разные промежутки времени. С увеличением времени обработки активность фермента, вероятно, будет постепенно снижаться, так как сама обработка приводит к денатурации белков либо в результате нагревания, либо под действием сил сдвига в ходе измельчения материала. Часто бывает необходимо охлаждать систему в процессе разрушения клеток. Для этого применяют охлажденный буфер и короткие периоды обработки материала чередуют с периодами охлаждения. Как упоминалось в предыдущем разделе, очень важно учитывать объем экстрагирующего буфера на грамм материала. При использовании больших количеств исходного материала приходится идти на компромисс между желанием добиться максимальной экстракции и стремлением получить минимальный объем экстракта.

До сих пор мы не говорили о природе экстрагирующего буфера, за исключением того, что для определенных целей он должен содержать вещества типа β-меркаптоэтанола. Для экстракции можно использовать и воду, но она экстрагирует не все белки. Было бы замечательно, если интересующий нас фермент полностью экстрагировался бы водой. Клетки содержат разные соли и много нерастворимого, несущего заряд материала — белки, фосфолипиды, нуклеиновые кислоты. Ионная сила в цитоплазме типичной клетки колеблется в пределах 0,15—0,2 М. В этих условиях цитоплазматические белки «растворимы» в том смысле, что они могут перемещаться в клетке. При гомогенизации клеток с 2—3 объемами воды ионная сила гомогената может снизиться до 0,05 и ниже. В этих условиях заряженные частицы в растворе могут действовать в качестве ионообменников и адсорбировать белки, особенно оснóвные.

В литературе имеется много данных о распределении ферментов между растворимой и нерастворимой фракциями. Если гомогенат готовится на разбавленном буфере, то чем больше

добавляется буфера, тем бо́льшая часть белка переходит в нерастворимую фракцию [15]. Не всегда учитываются ионообменные адсорбционные свойства (в отличие от физиологически важных специфических взаимодействий) клеточных компонентов. Для того чтобы быть уверенным, что все «растворимое» содержимое клетки перешло в экстракт, следует использовать буфер с ионной силой, близкой к физиологической, и, конечно, с соответствующим значением pH. Если при этом экстрагируется слишком много нежелательных компонентов, лучше пойти на компромисс. Обычно используют следующие буферы: 20—50 мМ фосфат, pH 7—7,5, 0,1 М трис-HCl, pH 7,5 и 0,1 М KCl с небольшим содержанием в нем буфера; для выделения органелл применяют изоосмотические буферные смеси, содержащие наряду с солями и буферными ионами сахарозу, маннит или сорбит. Буфер может содержать также ЭДТА (1—5 мМ), β-меркаптоэтанол или цистеин (5—20 мМ) и специфические стабилизирующие агенты для определенных белков, например Zn^{2+} для цинкосодержащих белков или пиридоксальфосфат для ферментов, использующих его в качестве кофактора.

После разрушения клеток в соответствующем буфере желательно проверить pH гомогената. Хотя после гомогенизации действительно свежего материала в буфере гомогенат имеет тот же pH, что и буфер, это значение может снизиться вследствие метаболических процессов, ведущих к закислению среды. Хорошим примером могут служить скелетные мышцы, в которых гликоген быстро превращается в молочную кислоту, и pH гомогената может упасть с 7,0 до 6,0 за 30—60 мин (включая время центрифугирования). В таких случаях перед центрифугированием значение pH можно поднять выше нужной величины (например, 1 М трис-буфером). Кроме того, добавление ингибитора гликолиза может остановить процесс. Для этой цели иногда используют фторид (10—30 мМ).

Эти общие замечания относятся к улучшению условий экстракции всех растворимых компонентов. При экстрагировании какого-то одного фермента лучше использовать другие условия, при которых не происходит полной солюбилизации всех компонентов, тогда как нужный фермент экстрагируется полностью.

Часто экстракт получается мутным. После центрифугирования на его поверхности могут плавать частицы жира. Жир можно удалить грубой фильтрацией через стекловату или плотную фильтровальную ткань. Нерастворимые частицы суспензии содержат органеллы и фрагменты мембран, которые полностью осаждаются только при 100 000 g — процедура очень неудобная для больших объемов экстракта. Фильтрация в таких случаях обычно бесполезна, так как если фильтр достаточно плотен и задерживает частицы, то он быстро засоряется. Однако, если

мутность незначительна, но нужен прозрачный экстракт — например, для пропускания через адсорбционную колонку, — фильтрацию можно провести с помощью целита (разд. 1.2).

Теперь рассмотрим различные типы экстрактов. При работе с некоторыми животными тканями частицы составляют незначительную часть экстракта и ими можно пренебречь. Они агрегируют, скажем, при первом же фракционировании сульфатом аммония и затем удаляются. С другой стороны, есть животные ткани, содержащие больше жиров и мембранных структур; при экстрагировании таких тканей образуются суспензии. Подкисление среды до pH 6,0—5,0 обычно приводит к агрегации материала, который можно затем отцентрифугировать при относительно низкой скорости. Рибосомы и другие нуклеопротеиды обычно удаляются при подкислении, которое можно рассматривать как одну из форм изоэлектрического осаждения (разд. 3.2); фосфатные группы протонируются и нейтрализуют или по крайней мере снижают заряд частиц суспензии. Этот способ дает очень хорошие результаты при условии, что нужный фермент а) не осаждается изоэлектрически при данном значении pH, б) не адсорбируется на образовавшемся осадке или в) остается стабильным при нефизиологических значениях pH. Экстракт охлаждают и снижают pH соответствующей кислотой (например, 1 М уксусной, разд. 6.1). После перемешивания в течение 10—20 мин осадок отделяют центрифугированием, а pH надосадочной жидкости доводят, если необходимо, до нужного значения перед тем, как приступить к первому этапу фракционирования. Растительные ткани отличаются прежде всего тем, что реакция среды в них более кислая и содержащиеся в них частицы, такие, как фрагменты хлоропластов, агрегируют значительно труднее. К тому же растительные экстракты содержат сравнительно мало корпускулярного материала, если не считать грубых частиц типа зерен крахмала, которые легко осаждаются после приготовления экстракта.

При приготовлении экстрактов из микроорганизмов возникает целый ряд проблем. Во-первых, из быстропролиферирующих клеток экстрагируется много нуклеиновых кислот. Во-вторых, в процессе разрушения клеток материал клеточной стенки либо сильно диспергируется, в результате чего раствор становится мутным, либо частично растворяется, так что в растворе наряду с белками и нуклеиновыми кислотами оказывается много камедеподобных полисахаридов. Это создает определенные трудности на первых этапах фракционирования.

Экстракты, приготовленные из бактериального материала при помощи пресса Френча, под воздействием ультразвука или при обработке лизоцимом, получаются вязкими из-за присутствия в них ДНК и содержат значительные количества рибосом-

ного материала. Все нуклеиновые кислоты осаждаются в результате их агрегации с макромолекулярными поликатионами. Хорошими реагентами для этого служат протамин лососевых рыб и клупеин молок сельди, поскольку связывание с ДНК — естественная функция этих веществ. С обычно используемым протаминсульфатом следует быть весьма осторожным: он обладает сильными кислотными свойствами, и перед употреблением его необходимо растворить в воде и нейтрализовать. Следует установить, какое количество протаминсульфата потребуется; оно может достигать 5 мг на 1 г обрабатываемого материала. Протаминсульфат осаждает ДНК, рибосомные нуклеиновые кислоты, мРНК, тРНК и другие нуклеиновые кислоты. На образовавшемся осадке могут также адсорбироваться некоторые белки. Адсорбцию на протаминовом осадке используют даже как этап в процессе очистки ферментов [16, 17]. Если применение протамина окажется невозможным или нежелательным, вязкость раствора ДНК можно снизить, используя при получении экстракта ДНКазу. Рибосомы можно осаждать стрептомицином. Хотя стрептомицин хуже осаждает нуклеиновые кислоты, чем протамин, при его использовании теряется меньше белка в результате адсорбции на образующемся осадке.

После удаления нуклеиновых кислот в растворе могут остаться капсульные камедеподобные углеводы. Это создает трудности при использовании обычных методов осаждения белков. В присутствии этих веществ невозможно применение сульфата аммония и других методов фракционного осаждения. Лучше полностью осадить белок в надежде, что камедеподобные вещества останутся в растворе. Практически весь белок можно осадить при 80%-ном насыщении сульфатом аммония (разд. 3.3) или 55%-ной концентрации ацетона (разд. 3.4). В случае использования сульфата аммония для осаждения белка может понадобиться скоростное центрифугирование. Но даже после этого растворенный белковый осадок содержит вещества, снижающие воспроизводимость результатов при работе на колонке или при использовании других методов фракционирования.

Недавно найдены два пути преодоления этих трудностей. Первый путь — это «амфифильная» адсорбция на геле агарозы (разд. 4.8), при которой все белки адсорбируются на гранулах агарозы в растворе сульфата аммония 70—80%-ного насыщения, тогда как небелковый материал вымывается. При экстракции гранул агарозы буфером белок переходит в раствор, который далее фракционируют обычным способом. Второй путь — использование соответствующего метода экстракции. При обработке клеток лизоцимом обычно не образуется слишком много капсульных камедеподобных веществ — лизоцим растворяет их, но не разрушает все бактериальные клетки. Для получения до-

статочно прозрачного экстракта из бактерий успешным оказалось использование лизоцима вместе с неионным детергентом [14]. После удаления нуклеиновых кислот такой экстракт можно непосредственно использовать для фракционирования. Подобные проблемы возникают при работе не со всеми бактериями. Опубликовано множество работ по выделению ферментов из бактериального материала, в которых успешно проводится обычное фракционирование вслед за обработкой экстракта протамином или стрептомицином.

Приготовление экстрактов из дрожжей связано с несколькими проблемами. Главная из них состоит в том, что клеточные стенки у грибов очень толстые и их трудно разрушить. Поэтому для получения экстракта требуются более эффективные методы. Если экстракт нужно получить быстро, единственный надежный способ — это применение вибрационной шаровой мельницы или гомогенизатора Мэнтона — Гаулина. При использовании этих методов образуется большое количество частиц низкой плотности, которые не полностью удаляются центрифугированием. Мутность может снизить эффективность осаждения белка сульфатом аммония. Однако ее можно устранить путем агрегации частиц в органическом растворителе (ацетон, 20—25% по объему при 0 °С). В прозрачном растворе остается большинство ферментов, которые осаждаются при повышении концентрации ацетона (разд. 3.4). Прозрачные экстракты получают также, используя автолиз толуолом, но в этих условиях может происходить протеолитическое расщепление белков.

Для выделения очень стабильного фермента фосфоглюкомутазы применяют цитолиз под действием концентрированного аммиака [13]. Эта процедура разработана и широко применяется при работе с «активными сухими» дрожжами. Ее используют для получения прозрачных экстрактов, содержащих бóльшую часть гликолитических ферментов [18]. Некоторые ферменты полностью разрушаются при высоких значениях pH. При использовании этого метода протеолиз не представляет серьезной проблемы, так как активность протеаз достаточно низка при pH 9,5—10. Эффективность экстракции может значительно варьировать в зависимости от партии дрожжей.

Теперь можно было бы перейти к обсуждению методов очистки; экстракт, содержащий значительную часть фермента, получен, из него удалены частицы и небелковый материал. Но перед тем, как закончить эту главу, следует остановиться на классе ферментов, который не затрагивался в предыдущих разделах. Это нерастворимые ферменты, ассоциированные с частицами. По определению, они отсутствуют в прозрачном экстракте.

2.4. МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ОЧИСТКЕ ФЕРМЕНТОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ЧАСТИЦАМИ

В этом разделе кратко рассматриваются методы работы, используемые для выделения ферментов, структурно связанных с нерастворимыми компонентами клетки, такими, как митохондрии, хлоропласты, плазмалемма, эндоплазматический ретикулум и ядерные мембраны. Эти методы не применяются к водорастворимым ферментам, заключенным внутри органелл, например к белкам митохондриального матрикса, а лишь к ферментам, ковалентно связанным или прочно ассоциированным с частицами. Существенной степени очистки по сравнению с исходным материалом можно добиться, многократно промывая гомогенат буфером, в котором данный фермент не растворяется. После этого возможны два подхода к решению проблемы. Можно фракционировать осадок методом дифференциального центрифугирования (седиментация или градиент плотности), с помощью электрофореза или «молекулярных сит».

Другой способ заключается в солюбилизации фермента (субфракционирование, конечно, может предшествовать солюбилизации). Не все ферменты способны существовать в солюбилизированном состоянии, будучи изолированы от их нормального клеточного окружения; поэтому успех очистки таких ферментов зависит от того, насколько полно можно отделить фрагменты частиц, содержащие фермент, от прочего корпускулярного материала.

Фермент, связанный с частицами, может быть солюбилизирован различными путями. Во многих случаях солюбилизированные ферменты ведут себя в дальнейшем как все водорастворимые ферменты, и их фракционирование может быть проведено с помощью процедур, описанных в гл. 3—5. С другой стороны, иногда возникает необходимость солюбилизировать фермент, используя детергенты. В этом случае детергент, связанный с белком, замещает липидсодержащую мембрану. Если впоследствии детергент удаляют, белок может денатурировать или по крайней мере агрегировать и выпадать из раствора.

Бóльшая часть подробно изученных мембраносвязанных ферментов относится к первой категории: их можно выделить с помощью физических, химических или энзиматических методов; полученный раствор фракционируют далее обычным способом. Много таких ферментов содержится в митохондриях, в том числе ферменты, ассоциированные с системой переноса электронов. Для их выделения используют следующие методы [19]:

а) Разрушение митохондрий для выделения белков матрикса с последующим выделением мембранных белков из митохондриальных фрагментов с помощью 1) ультразвука, особенно

при высоких значениях pH и повышенной температуре, 2) щелочи (pH 8—11) в присутствии или отсутствие агентов, образующих хелаты металлов (ЭДТА), 3) солюбилизации под действием детергентов, 4) органических растворителей (например, получение ацетонового порошка, экстракция *н*-бутанолом, этанолом и т. д.), 5) фосфолипазы А для расщепления липидов мембраны.

б) Классический способ, до сих пор находящий применение и заключающийся в экстракции липидов и получении ацетонового порошка [20]. Суспензию частиц обрабатывают несколькими объемами ацетона при очень низкой температуре (например, —20 °С или ниже). Полученный таким образом обезвоженный порошок может храниться долгое время. Белки растворяют, диспергируя их в водном буферном растворе.

Типичным примером выделения мембраносвязанного фермента без использования детергентов служит получение АТР-азного комплекса из митохондрий сердца быка [21]. Прежде всего выделяют митохондрии с помощью метода, дающего наибольший выход. Затем для высвобождения белков матрикса митохондрии обрабатывают ультразвуком. Значение pH доводят до 9,2 в присутствии ЭДТА и снова проводят озвучивание, после чего бóльшая часть мембранных белков митохондрий переходит в раствор. Активную водорастворимую АТР-азу выделяют из полученного раствора изоэлектрическим осаждением (разд. 3.2) и хроматографированием на ДЭАЭ-сефадексе (разд. 4.3).

Большинство мембраносвязанных белков можно экстрагировать из мембран в присутствии детергентов, в состав которых входят липофильные цепи, взаимодействующие с гидрофобными поверхностями белка и вытесняющие его из комплекса с нормальной мембраной. Из детергентов, используемых для этой цели, наиболее широко применяются дезоксихолат натрия и тритон. Тритон — это торговое название целой серии в большинстве своем неионных детергентов на основе полиэтиленгликоля. Наиболее часто в различных целях используют тритон X-100 (рис. 2.3), хотя детергенты других типов также находят определенное применение. Особенно полезным является недавно описанное цвитерионное производное холевой кислоты [22]. Детергенты способны вытеснять белок, прочно связанный с мембраной гидрофобными взаимодействиями, благодаря тому, что они, во-первых, растворяют мембрану и, во-

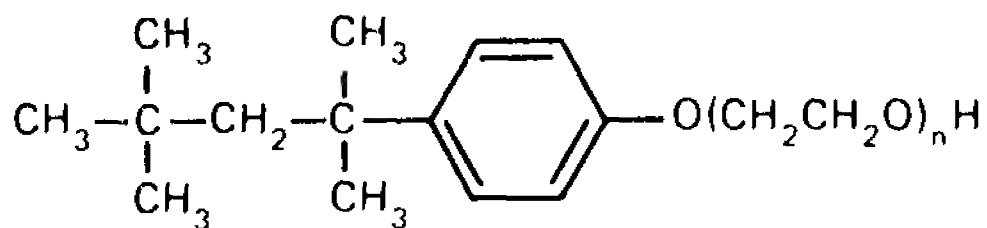


Рис. 2.3. Структура тритона X-100.

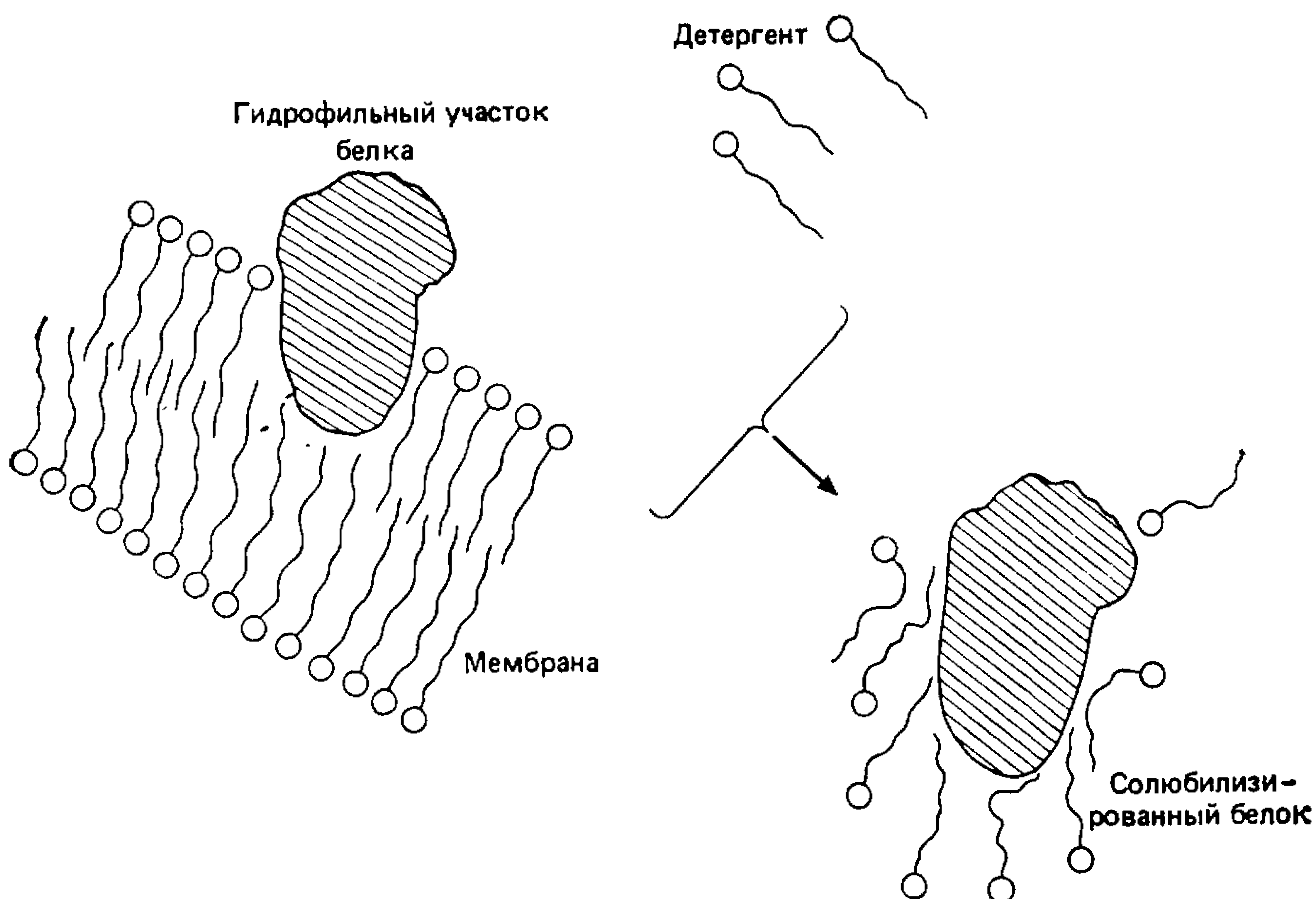


Рис. 2.4. Действие детергента при солюбилизации мембранного белка. В зависимости от соотношения белка и детергента в растворе солюбилизированный белок может находиться в состоянии, показанном на рисунке, или образовывать с детергентом более сложную мицеллу.

вторых, замещают компоненты мембраны алифатическими или ароматическими цепями, которые составляют липофильную часть детергента (рис. 2.4).

Если белок солюбилизирован и установлено, что его целостность не нарушена, можно провести фракционирование, подобное описанному в следующих главах. В большинстве случаев это не представляет особой проблемы. Необходимо сохранить активность фермента; это зависит от выбора подходящего детергента. Неионные детергенты, такие, как тритон Х-100, очень мягки по своему действию, и большинство белков, как связанных с мембранами, так и свободных, выдерживают концентрации тритона Х-100 до 1—3% (вес/ об.) Напротив, некоторые анионные детергенты (например, додецилсульфат) обладают наряду с солюбилизирующими свойствами очень сильным денатурирующим действием. Они, по-видимому, не найдут широкого применения при выделении ферментов.

Липопротеины содержат ковалентно- или нековалентно- (но прочно) связанный липид, который в свою очередь погружен в мембрану и служит связующим звеном между белком и ча-

стицей. Экстракция в присутствии детергента может привести к удалению липида и замещению его детергентом. Это может быть причиной потери ферментативной активности, которая восстанавливается при добавлении природного липида — обычно фосфатида. С такими белками особенно трудно работать, так как они очень чувствительны к соотношению в растворе детергента и липида. Удаление детергента неизменно ведет к агрегации и чаще всего к денатурации.

Избыток детергента может мешать фракционированию. Например, высаливание сульфатом аммония приводит к появлению на поверхности раствора слоя тритона Х-100, в котором часто содержатся нужные белки. Однако эффективного разделения при этом не происходит. Можно провести колоночную хроматографию или отделить белки с помощью гель-фильтрации (разд. 5.1), но не исключено, что мицеллы детергента будут двигаться в той же зоне, что и белок, и, следовательно, окажутся в одной фракции. Ионообменная хроматография успешно осуществляется в присутствии неионных детергентов (разд. 4.2 и 4.3). Действительно, тритон Х-100 в концентрации до 1% оказывает незначительное влияние на ионообменные свойства нормальных водорастворимых белков. Но солюбилизированные белки мембран могут находиться только в составе детергентных мицелл, что существенно влияет на процесс ионного обмена. Если исследуемый белок удается адсорбировать на ионообменнике, то избыток детергента свободно проходит через колонку. Это позволяет элюировать свободный (относительно) от детергента белок. С другой стороны, если полное удаление детергента приводит к денатурации белка, то, чтобы предотвратить это, в буфер вносят небольшое количество детергента (<0,1%). Собранная фракция будет, конечно, тоже содержать некоторое количество детергента. Тем не менее, так как обычно из смеси белков выделяют какой-то определенный фермент, присутствие в конечном препарате незначительной концентрации чистого детергента, не загрязненного жирами, не принесет большого вреда. Методы удаления избытка детергентов были недавно суммированы в обзоре [23].

Исчерпывающее обсуждение методов экстракции водорастворимых ферментов из мембран читатель найдет в другой работе [19]. Белки, связанные с мембранами, очевидно, отличаются по растворимости от типичных цитоплазматических ферментов, и для их очистки иногда применяются (и вполне успешно) некоторые необычные эмпирически найденные методы.

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПУТЕМ ОСАЖДЕНИЯ

3.1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

На ранних этапах становления белковой химии единственным применяемым на практике способом разделения белков различных типов было осаждение части белковой смеси за счет изменения некоторых свойств растворителя. Далее осадки отфильтровывали и растворяли в исходном растворителе. И до сих пор эти процедуры занимают важное место в процессе очистки белков, однако теперь в большинстве случаев фильтрация заменяется центрифугированием. Белковые осадки представляют собой достаточно крупные агрегаты белковых молекул, так что их можно отцентрифугировать при относительно низкой центробежной силе. В некоторых случаях агрегация идет дальше и осадок флоккулирует, тем не менее размеры агрегатов обычно остаются небольшими вследствие движений и столкновений частиц суспензии. Это приводит к засорению бумажных фильтров, и возникает необходимость в центрифугировании при существенно более высоких ускорениях чем 1 *g*. Различные способы получения осадка описаны ниже в отдельном разделе.

Первоначально белки классифицировали в зависимости от их растворимости, и, хотя сейчас эта классификация в основном уже забыта, соответствующие названия до сих пор используют, когда речь идет о сывороточном альбумине или иммуноглобулинах. Глобулинами называли белки, нерастворимые при низких концентрациях соли в растворе; сывороточные глобулины можно осадить, просто разводя сыворотку водой, при этом альбумины остаются в растворе. Поведение глобулинов — пример изоэлектрического осаждения белков в области «всаливания» (разд. 3.2). Однако эта классификация порождает путаницу, так как некоторые белки нерастворимы при pH 6, но растворимы при pH 8 и более низкой концентрации соли. Тем не менее существуют белки, которые по своим свойствам полностью соответствуют глобулинам. Это обычно белки с низкой растворимостью в водной среде, несущие на своей поверхности значительное число гидрофобных аминокислотных остатков. И наоборот, есть много истинных альбуминов, хорошо растворимых в воде и характеризующихся низкой гидрофобностью.

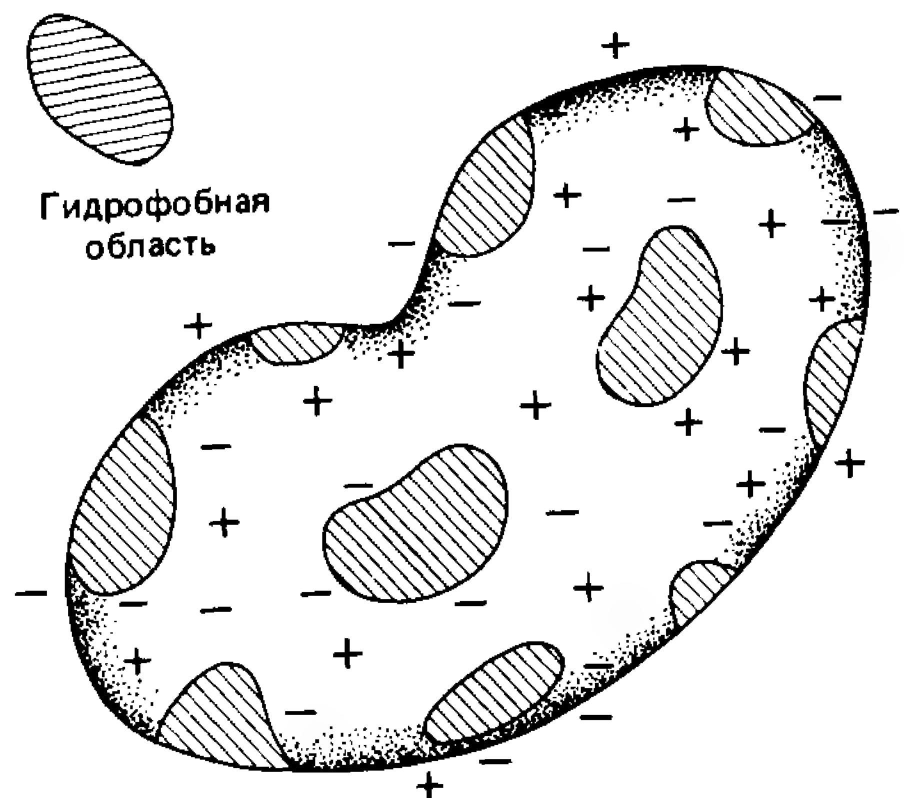


Рис. 3.1. Распределение зарядов и гидрофобных областей на поверхности молекулы типичного белка.

Распределение гидрофильных и гидрофобных остатков на поверхности белковой молекулы является признаком, определяющим растворимость белка в различных растворителях. Хотя гидрофобные группы стремятся сконцентрироваться внутри белковой молекулы, значительная их часть располагается на поверхности и контактирует с растворителем (рис. 3.1). Гидрофобным группам на поверхности молекул наряду с заряженными и другими полярными группами принадлежит важная роль в определении поведения белков. Основным компонентом растворителей всегда является вода, хотя есть основания предполагать, что, например, интегральные мембранные белки можно было бы выделять, используя неводные растворители. Для изменения растворимости белка можно манипулировать свойствами воды как растворителя, изменяя ионную силу, pH, количество добавляемых, смешивающихся с водой, органических растворителей и других инертных веществ или полимеров, а также комбинируя эти изменения с изменениями температуры. Чаще всего для селективного осаждения белков используют нейтральные соли. Это и будет предметом обсуждения двух следующих разделов.

3.2. РАСТВОРИМОСТЬ БЕЛКОВ ПРИ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛЕЙ

Бóльшая часть ферментов находится в клеточной жидкости в виде растворимых белков, причем часто их содержание в концентрированной смеси может достигать 40% [24]. Таким образом, они хорошо растворимы при физиологических концентрациях солей, ионной силе около 0,15—0,2 М и нейтральном значении pH. В процессе экстракции эти условия могут легко меняться, хотя повышение концентрации белка (путем удале-

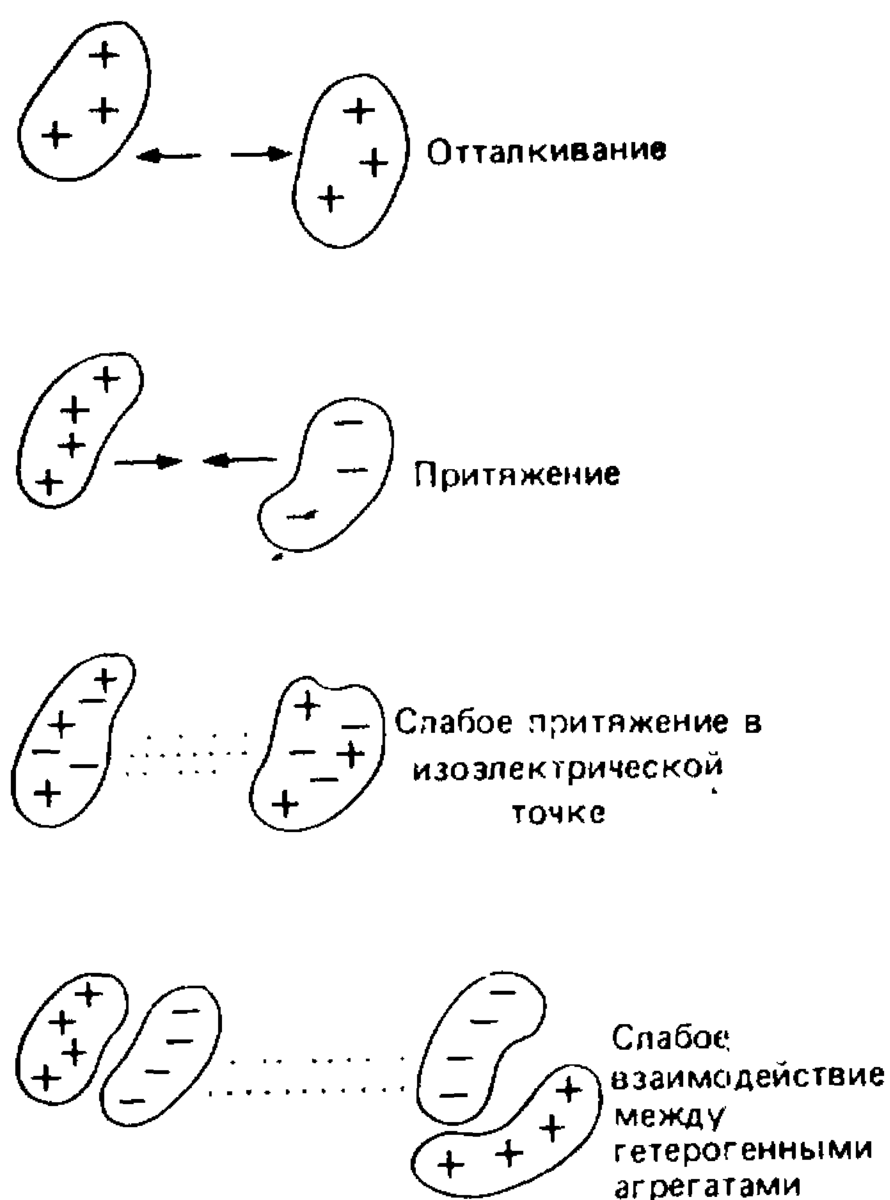


Рис. 3.2. Электростатические взаимодействия между молекулами белка и небольшими агрегатами молекул.

ния растворителя) или значительное снижение ионной силы (путем удаления низкомолекулярных ионов) связано с определенными неудобствами. Растворимость можно рассматривать как результат полярного взаимодействия растворенного вещества с водным растворителем и ионных взаимодействий его с присутствующими солями, а также в некоторой степени как результат электростатических сил отталкивания между одноименно заряженными молекулами или небольшими (растворимыми) агрегатами молекул. В небольших агрегатах сильные разноименные заряды взаимопогашаются (рис. 3.2). Некоторые белки образуют осадок при ионной силе от нуля до физиологического значения вследствие того, что силы отталкивания между молекулами недостаточны. Например, если поверхность глобулы характеризуется высокой гидрофобностью, то это значит, что лишь малая ее часть взаимодействует с растворителем и соответственно меньшее число заряженных групп реагирует с солями. Если заряд снижается до нуля, электростатическое отталкивание уменьшается и по мере приближения к изоэлектрической точке молекулы притягиваются друг к другу (рис. 3.3). Этот процесс называется изоэлектрическим осаждением: растворимость белка типа глобулина минимальна при значении pH, близком к его изоэлектрической точке, которая может быть достаточно низка, чтобы привести к осаждению белка. В смеси белков ситуация осложняется соосаждением: разные белки со

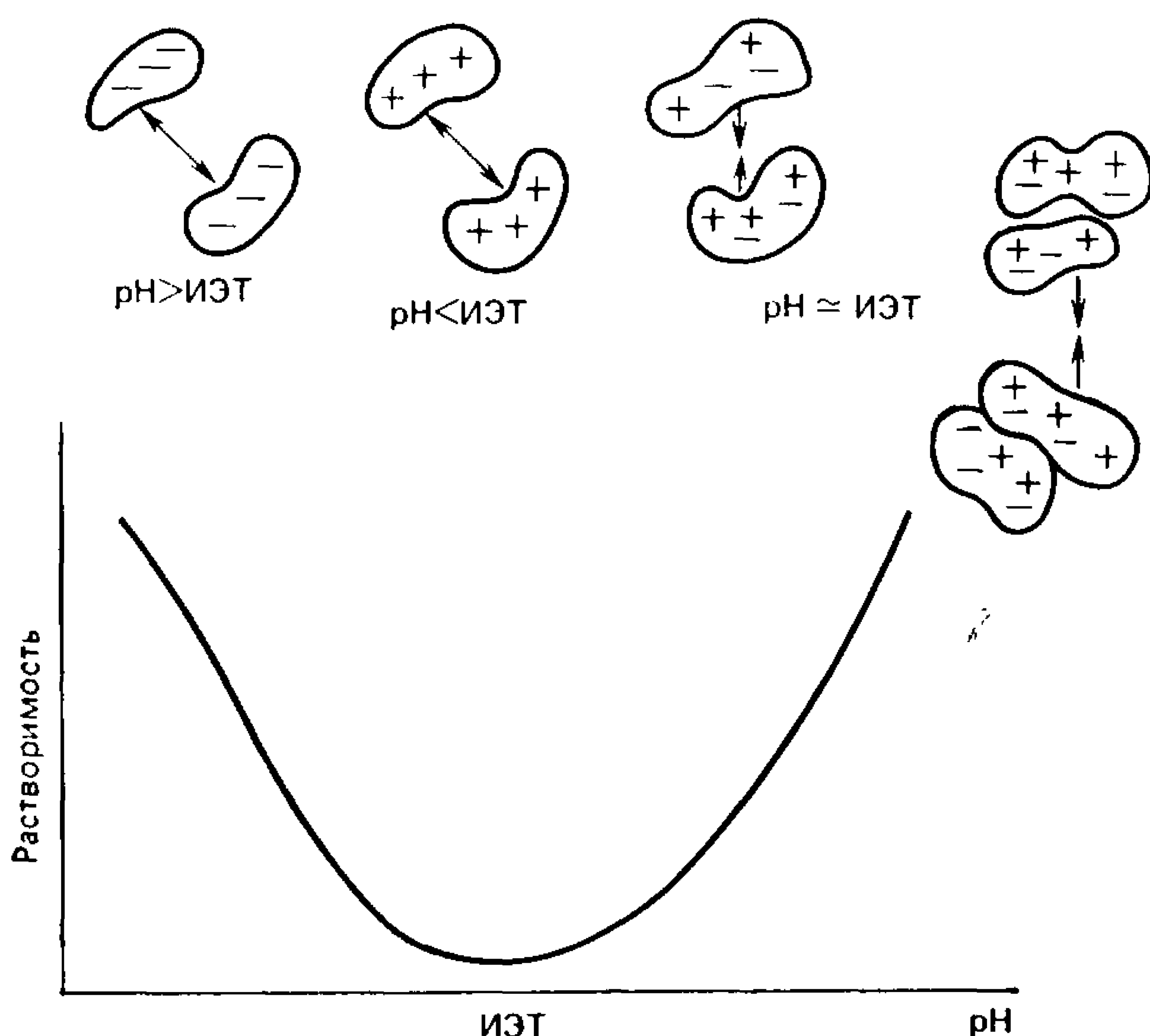


Рис. 3.3. Растворимость белка, обладающего свойствами глобулина, при значениях pH, близких к изоэлектрической точке (ИЭТ).

сходными свойствами агрегируют и осаждаются при достижении изоэлектрической точки. Во многих случаях такие осадки образуются в тканевом экстракте при понижении pH до значений от 6,0 до 5,0. При этом агрегируют не только растворимые белки, но и частицы, например рибосомы и фрагменты мембран, о чем говорилось выше (разд. 2.3).

Растворимость белков типа глобулинов уменьшается по мере снижения концентрации соли. Это свойство редко используется при работе с грубым экстрактом, так как двукратного снижения концентрации соли можно легко добиться только при добавлении равного объема воды. Если же растворимость не удается снизить более чем в два раза, никакого осадка не образуется. Однако это свойство может быть полезным (хотя иногда и создает неудобства) на дальнейших этапах очистки, когда обессоливание проводят посредством диализа или гель-фильтрации. При диализе против буфера с низкой ионной силой в диализном мешке может образоваться осадок. Если этот осадок содержит бóльшую часть нужного фермента или, наоборот, не содержит его, то достигается определенная степень очистки. Осадок отделяют центрифугированием. Однако в процессе гель-фильтрации могут возникнуть неприятности из-за изоэлектрического осаждения белка в колонке. Агрегаты могут забить ко-

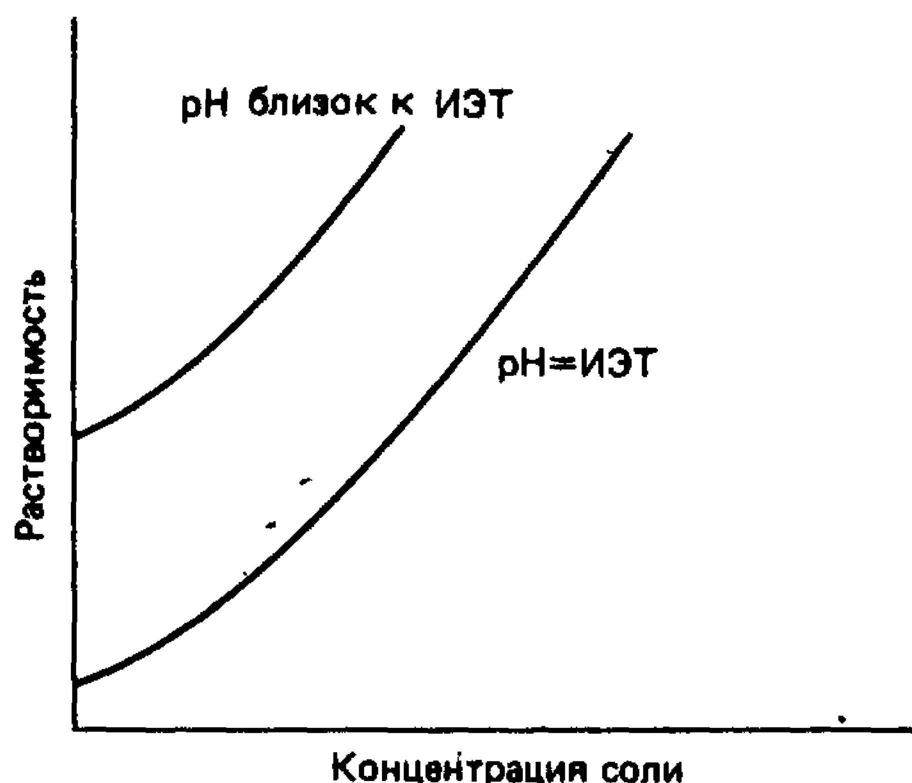


Рис. 3.4. Растворимость белка, являющегося глобулином, при определенном значении pH, близком к изоэлектрической точке (ИЭТ), и различных концентрациях соли.

лонку, или, осаждаясь и связываясь с адсорбентом, они удерживаются в колонке до тех пор, пока вновь не произойдет растворение осадка за счет солей, удаленных из исходного белкового раствора. В этих условиях обессоливание методом гель-фильтрации может вовсе не происходить (разд. 1.4).

Изоэлектрическое осаждение белков с низкой растворимостью можно усилить введением в раствор вещества, снижающего растворимость белка. Осадок можно получить, добавляя в раствор органические растворители или полиэтиленгликоль и одновременно изменяя значение pH (разд. 3.4 и 3.5). Примером использования такого метода служит очистка фосфофруктокиназы дрожжей [17].

Увеличение растворимости белка (при данных pH и температуре) с повышением концентрации соли известно как «всаливание». При очистке ферментов чаще используется обратный процесс, осуществляемый путем разведения и диализа. Типичная кривая «всаливания» чистого белка дана на рис. 3.4. Чтобы при разбавлении раствора могло произойти осаждение белка, кривая зависимости растворимости от концентрации соли должна иметь достаточную крутизну.

Практические рекомендации

Бóльшая часть осадков, полученных изоэлектрическим осаждением, представляет собой агрегаты разных белков, в состав которых могут входить фрагменты органелл и комплексы белков с нуклеиновыми кислотами. Если исходный состав раствора меняется, выделяемый фермент в отсутствие его партнеров по осаждению будет иметь уже другую растворимость. Изоэлектрическое осаждение обычно происходит при значениях pH ниже физиологического. Поэтому следует убедиться, что фер-

мент стабилен при используемом значении pH. Стабильность белка повышается, а растворимость его снижается при низкой температуре. Однако, если pH устанавливают при 0 °С, не надо забывать, что pH-метр необходимо откалибровать при той же температуре, используя для этого охлажденный стандартный буфер (разд. 6.1).

Подводя итог всему сказанному выше, следует отметить, что область «всаливания» может быть использована в процессе очистки двумя способами. Во-первых, агрегация может происходить при разведении и диализе, и, если нужный фермент присутствует в агрегате, очистка будет эффективной. Во-вторых, можно применять изоэлектрическое осаждение, используя изменение растворимости в зависимости от pH при постоянной ионной силе. В любой из этих двух ситуаций степень достигнутой очистки обычно оказывается минимальной, если нужный фермент остается в растворе, так как при этом в осадок выпадает чаще всего лишь относительно незначительная часть всего белка. В этом случае достигается только осветление экстракта (разд. 2.3).

3.3. ВЫСАЛИВАНИЕ ПРИ ВЫСОКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СОЛИ

Общие аспекты растворимости белков при высокой концентрации соли

В этом разделе описан один из наиболее широко применяемых способов очистки ферментов — высаливание белков при высокой концентрации солей. Этот способ отличается по своему результату от «всаливания», описанного в разд. 3.2. Хотя белки типа глобулинов (т. е. белки, растворимость которых низка при низкой ионной силе вблизи их изоэлектрической точки) обычно характеризуются также относительно низкой растворимостью и при высокой концентрации соли, из этого правила есть много исключений. Так, сывороточные γ-глобулины, типичные белки, нерастворимые при низкой солевой концентрации, осаждаются сульфатом аммония (при относительно низкой его концентрации — около 1,5 М). С другой стороны, некоторые другие сывороточные глобулины (α и β) обладают более высокой растворимостью в сульфате аммония и осаждаются им при концентрации около 2,5—3,0 М. Процесс высаливания в основном зависит от гидрофобности белка, тогда как «всаливание» в большей степени определяется распределением зарядов на поверхности белковой глобулы и полярными взаимодействиями ее с растворителем.

В растворе типичная белковая молекула имеет гидрофобные участки (боковые цепи Phe, Tyr, Trp, Leu, Ile, Met и Val).

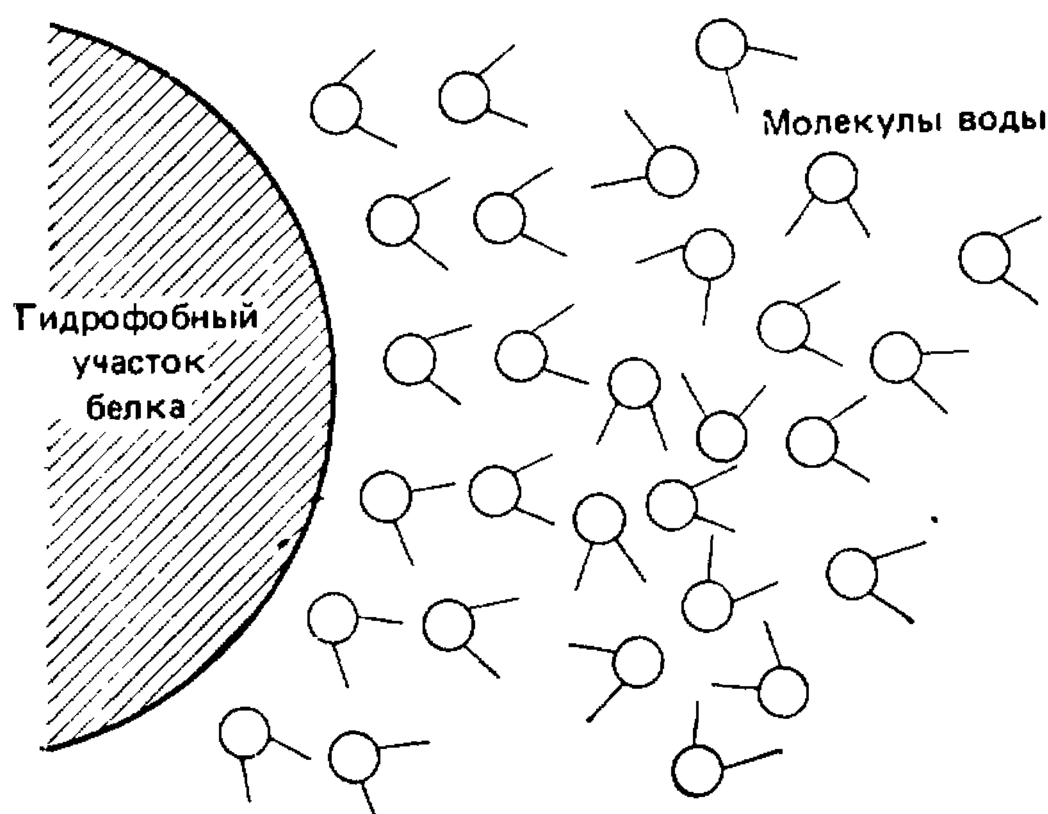


Рис. 3.5. Упорядоченное расположение молекул воды вокруг гидрофобных остатков на поверхности белка.

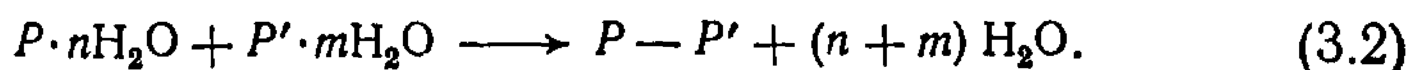
Их соприкосновение с водным растворителем приводит к упорядочению структуры воды, которая как бы «замораживается» вокруг боковых цепей аминокислотных остатков (рис. 3.5) [25]. Такое упорядочение структуры термодинамически неустойчиво, так как в подобной системе происходит значительное снижение энтропии по сравнению с системой негидратированный белок — свободные молекулы воды.

Если процесс растворения сухого белка в воде представить в виде



$$P + nH_2O \longrightarrow P \cdot nH_2O, \qquad (3.1)$$

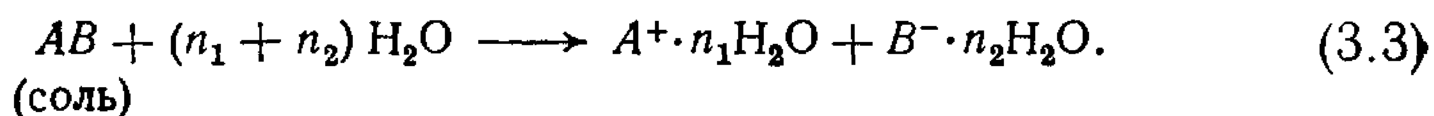
где nH_2O — молекулы воды, упорядоченно расположенные вокруг гидрофобных остатков (мы исключаем из рассмотрения молекулы воды, связанные с белком водородными и другими полярными связями), тогда ΔS^0 будет большой отрицательной величиной, что определяется степенью упорядочения молекул. Поскольку процесс растворения идет спонтанно, значение ΔG^0, очевидно, будет отрицательным. Следовательно, ΔH^0 также отрицательная величина ($\Delta H^0 = \Delta G^0 + T\Delta S^0$). Рассмотрим две близко расположенные молекулы белка, которые взаимодействуют своими гидрофобными остатками, освобождая при этом воду:



$$P \cdot nH_2O + P' \cdot mH_2O \longrightarrow P - P' + (n+m)\, H_2O. \qquad (3.2)$$

Ясно, что в этом случае ΔS^0 будет большой и притом положительной величиной. Можно ожидать, что изменение энтальпии данного процесса будет обратным по сравнению с ее изменением для процесса, описанного уравнением (3.1), т. е. будет положительным. Значит, величина ΔG^0 мала, а ее знак будет зависеть от относительных значений ΔH^0 и ΔS^0. При низкой концентрации соли ΔG^0 для типичного водорастворимого белка положительна. Так как белок растворим, заметной агрегации (уравнение 3.2) происходить не будет. Однако, если молекулы воды, освободившиеся в описанном процессе (3.2), захватываются какими-либо другими молекулами, взаимодействие белковых молекул может привести к агрегации белка. Ионы солей подвергаются гидратации, и поэтому при

добавлении значительного количества соли происходит связывание воды:



$$\underset{(\text{соль})}{AB} + (n_1 + n_2)\,H_2O \longrightarrow A^+ \cdot n_1H_2O + B^- \cdot n_2H_2O. \qquad (3.3)$$

Агрегация, описанная уравнением (3.2), наблюдается во всех случаях, когда белок освобождается от достаточного количества воды. Следует отметить, что ΔH^0 этой реакции положительна. В результате, согласно уравнению Аррениуса, агрегация, обусловленная гидрофобными взаимодействиями, усиливается с увеличением температуры. Это известная особенность гидрофобных взаимодействий. Осаждение белков при добавлении солей в большинстве случаев характеризуется положительным значением ΔH^0, так как *при данной концентрации соли* повышение температуры вызывает образование большего количества осадка.

Агрегацию гидрофобных участков на поверхности белка при высокой концентрации соли можно описать иными словами: по мере того как происходит сольватация ионов соли и свободных молекул воды остается мало, возрастает тенденция к отрыву упорядоченных «замороженных» молекул воды от гидрофобных боковых цепей с обнажением неполярных участков, которые стремятся взаимодействовать друг с другом. Белки, содержащие на поверхности молекул большое число или скопления гидрофобных аминокислотных остатков, агрегируют быстрее, тогда как белки с незначительным содержанием неполярных остатков на поверхности остаются в растворе даже при самых высоких концентрациях соли. Существуют и другие, более сложные интерпретации действия соли на растворимость белка, оперирующие понятиями свободной энергии. Эффективность действия различных солей коррелирует также с увеличением молярного поверхностного натяжения за счет соли, содержащейся в растворителе [26].

При высаливании исходной смеси белков происходит обильное выпадение в осадок соосажденных белков. Идентичные молекулы не стремятся отыскать друг друга, если поблизости есть другие «клейкие» молекулы. Тем не менее многие ферменты осаждаются из раствора в достаточно узкой области концентрации соли, что делает эту процедуру высокоэффективным методом фракционирования. На рис. 3.6 и 3.7 показана зависимость растворимости некоторых ферментов от присутствия в растворе других белков. Растворимость чистого белка эмпирически описывается формулой

$$\log(\text{растворимость}) = A - m \cdot (\text{концентрация соли}), \qquad (3.4)$$

где A — константа, зависящая от температуры и pH, а m — константа, не зависящая от температуры и pH. Значения этих величин для нескольких чистых белков даны в табл. 3.1. Для смеси белков это уравнение не подходит, так как степень соосаждения зависит от свойств других белков, присутствующих

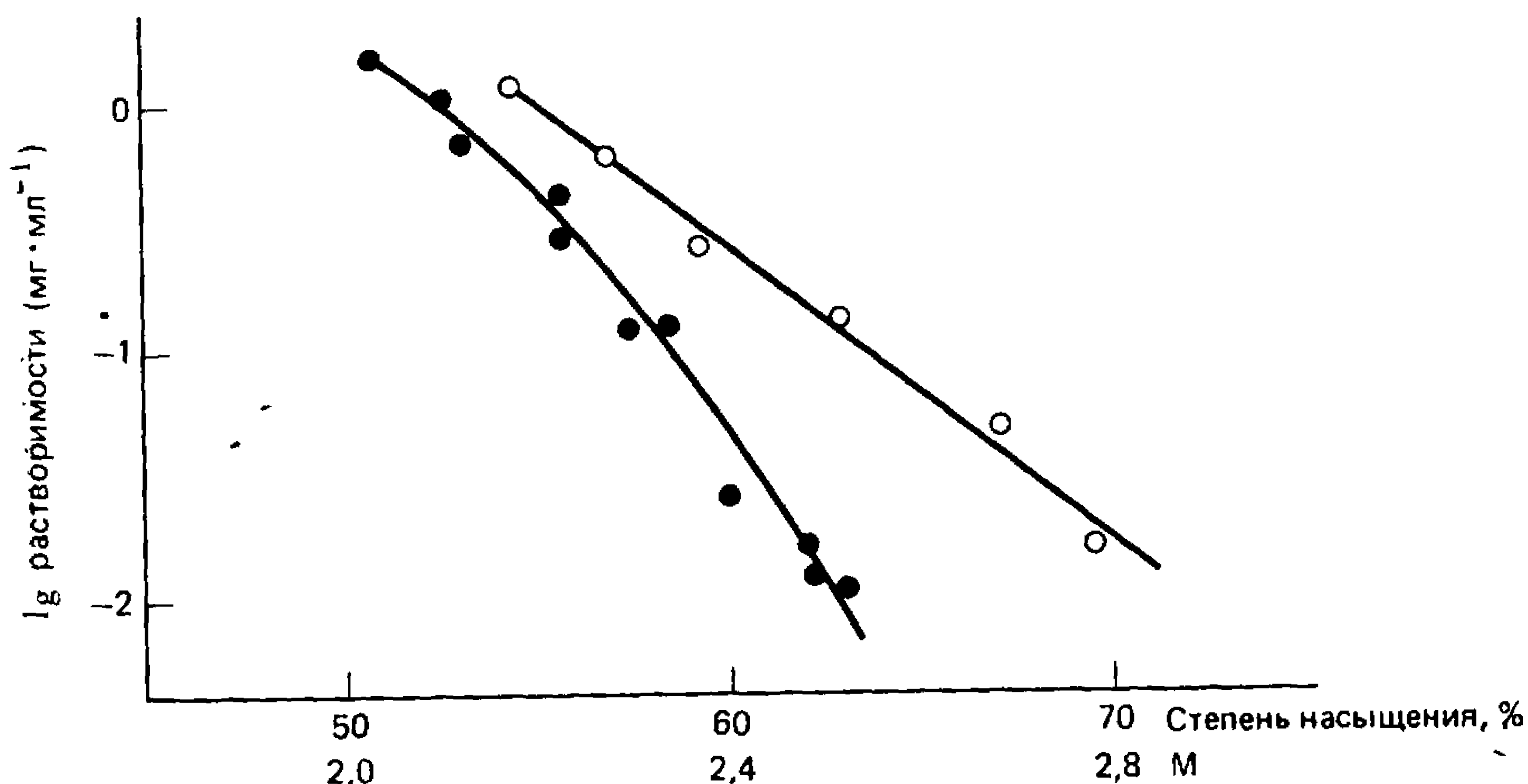


Рис. 3.6. Растворимость альдолазы из мышц кролика в растворе сульфата аммония при pH 7,0. Светлыми кружками обозначена растворимость чистого фермента: lg (растворимости) = 6,30—2,84× (конц. соли). Черные кружки означают растворимость смеси ферментов из мышц кролика — альдолазы, пируваткиназы, глицеральдегидфосфатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы в соотношении 3 : 3 : 3 : 1. (Неопубликованные результаты автора.)

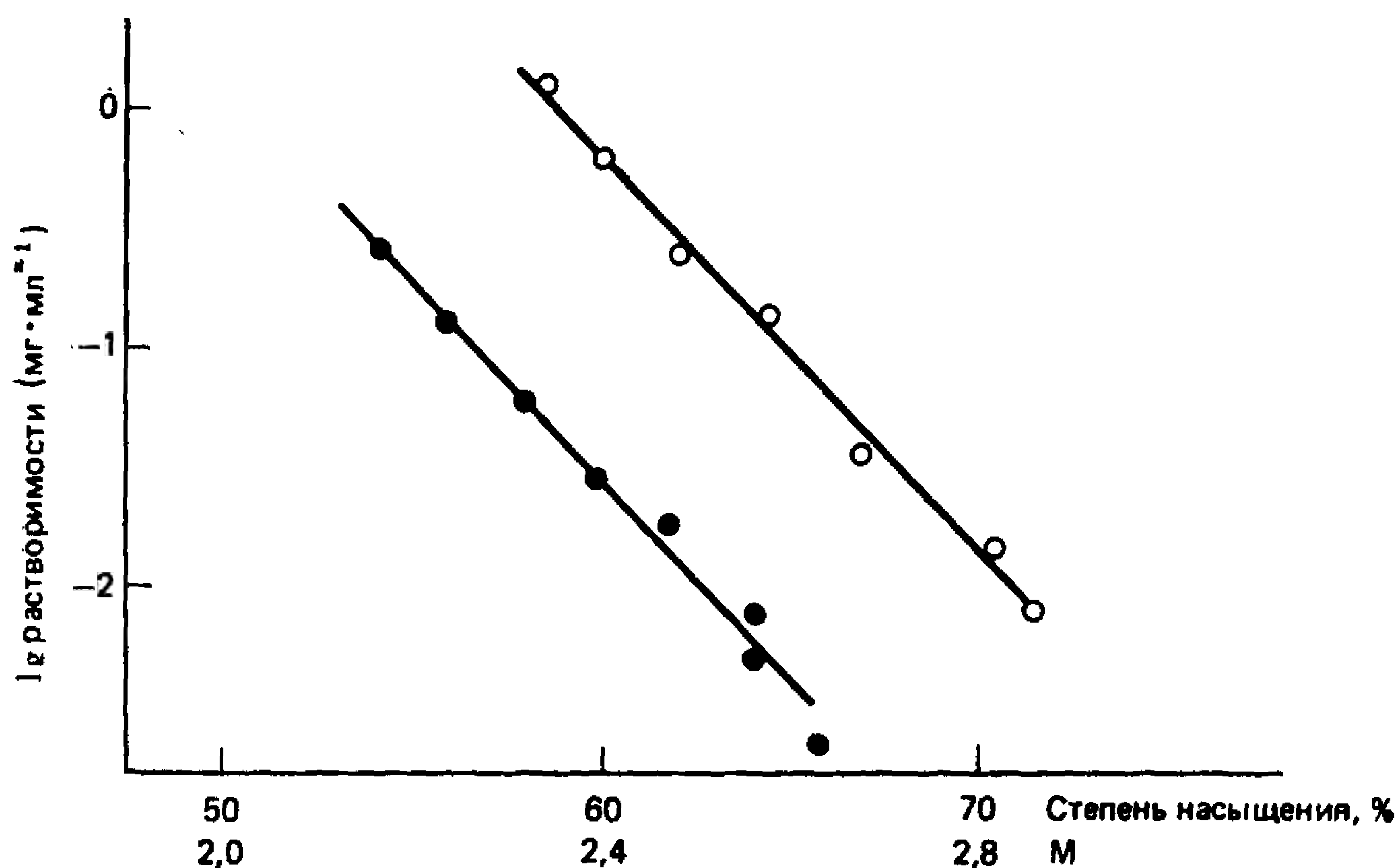


Рис. 3.7. То же, что и на рис. 3.6, но в данном случае была использована пируваткиназа. Светлые кружки — растворимость чистого фермента: lg (раств.) = 10,2—4,34× (конц. соли); черные кружки — смесь ферментов. (Неопубликованные результаты автора.)

Таблица 3.1. Некоторые значения констант A и m в уравнении (3.4) для очищенных ферментов при pH 7,0[1]

Белок	A	m	Концентрация сульфата аммония при растворимости, равной 1 $мг \cdot мл^{-1}$, М
Альдолаза из мышц кролика	6,30	2,84	2,20
Пируваткиназа из мышц кролика	10,2	4,34	2,34
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа из мышц кролика	8,6	2,48	3,34
Лактатдегидрогеназа из мышц кролика	8,0	3,97	2,02
Фосфоглицератмутаза из мышц кролика	9,85	4,26	2,32
Бычий сывороточный альбумин	9,2	3,26	2,84

[1]) Растворимость выражена в $мг \cdot мл^{-1}$.
Источник данных: неопубликованные наблюдения автора.

в растворе. Как правило, растворимость определенного компонента снижается в присутствии других белков.

Хотя высаливание в значительной мере определяется гидрофобными взаимодействиями, другие параметры также влияют на растворимость белков. Так, растворимость может изменяться при изменении pH; потеря заряда снижает полярность поверхности белка. Обычно самую высокую растворимость в солевых растворах белки имеют при pH 7, когда они содержат наибольшее число заряженных групп. С другой стороны, агрегация происходит легче вблизи изоэлектрической точки белка. Классический пример такой агрегации представляет одностадийная очистка глицеральдегидфосфатдегидрогеназы (КФ 1.2.1.12) из мышц кролика [27]. При pH 6 этот фермент растворим в 3,2 М сульфате аммония, но выпадает в осадок при pH 7,5 или выше, причем он может быть получен в кристаллическом виде даже из грубого экстракта. Его изоэлектрическая точка (по крайней мере при низкой концентрации соли) лежит при pH около 8,5.

Температура оказывает необычное действие на растворимость белков при высокой концентрации соли из-за того, что, как было сказано выше, она влияет на гидрофобные взаимодействия. В области высаливания растворимость белков обычно снижается с повышением температуры. Мутный белковый раствор, приготовленный для кристаллизации при комнатной температуре (разд. 9.3), часто становится абсолютно прозрачным при температуре 4 °С.

Практические соображения о фракционировании белков путем высаливания

Высаливание белков связано с растворением солей в растворе, содержащем белки. Следует рассмотреть некоторые особенности этого процесса. Очень важна природа соли. Помимо ее эффективности в смысле осаждения белков необходимо учитывать такие физические характеристики соли, как растворимость. Наиболее эффективные соли — это те соли, анионы которых имеют большой заряд (например, сульфат, фосфат и цитрат). Катионы в этом отношении сравнительно менее важны. По способности к высаливанию анионы располагаются в ряд Гофмейстера, который для некоторых обычных анионов выглядит следующим образом: SCN^-, I^-, ClO_4^-, NO_3^-, Br^-, Cl^-, CH_3COO^-, SO_4^{2-}, PO_4^{3-}. Хотя, судя по положению в этом ряду, фосфат более эффективен, чем сульфат, на практике при нейтральном значении pH фосфат состоит из смеси ионов HPO_4^{2-} и $H_2PO_4^-$, которые менее эффективны, чем PO_4^{3-}. Что касается эффективности действия катионов на осаждение белков, то моновалентные ионы можно расположить в следующий ряд: $NH_4^+ > K^+ > Na^+$. Из обычных недорогих солей эффективными осадителями белков являются сульфаты, фосфаты и цитраты натрия, калия и аммония.

При выборе соли необходимо учитывать стоимость килограммовых количеств достаточно чистого препарата, растворимость (нужны растворы высокой концентрации), а также особенности, связанные с нагреванием раствора. Нежелательно нагревать раствор во время растворения соли. Кроме того, большая величина ΔH^0 раствора свидетельствует о значительных изменениях растворимости в зависимости от температуры. Наконец, важное значение имеет плотность концентрированного раствора, так как эффективность центрифугирования при отделении осадка определяется разностью между плотностью белкового осадка и плотностью растворителя.

Соли калия в большинстве своем не подчиняются общим правилам растворимости, хотя фосфаты калия можно вполне использовать. Цитрат натрия очень хорошо растворим, но редко дает какие-либо преимущества при осаждении белков, за исключением того, что его можно использовать при pH выше 8. Что же касается солей аммония, то с ними невозможно работать при высоких значениях pH вследствие их буферного действия. По той же причине цитрат нельзя эффективно использовать при pH ниже 7. Сульфат натрия образует несколько гидратов и имеет сложную фазовую диаграмму растворимости. При низкой температуре его растворимость невысока. Он был использован для очистки яичного альбумина, причем температуру

поддерживали около 30 °С, чтобы соль имела достаточную растворимость. Только одна соль обладает всеми преимуществами и не имеет недостатков при работе с типичным белком — это сульфат аммония. Исключение составляют те случаи, когда нужно работать при высоких значениях рН.

Растворимость сульфата аммония очень мало меняется в области температур от 0 до 30 °С; концентрация насыщенного раствора в воде составляет приблизительно 4 *М*. Плотность этого насыщенного раствора равна 1,235 г·см$^{-3}$, а плотность белкового агрегата в таком растворе — 1,29 г·см$^{-3}$ (разд. 1.2). Раствор 3 *М* фосфата калия при рН 7,4 имеет плотность 1,33 г·см$^{-3}$. Так как белковый осадок в этом растворе обладает такой же плотностью, его невозможно отделить центрифугированием. Однако отделение осадка можно осуществить с помощью фильтрации или же путем адсорбции на амфифильном носителе, например агарозе (разд. 4.8). Осаждение белков 3—4 *М* сульфатом аммония иногда также может быть затруднено из-за избыточной плотности, создаваемой присутствием в грубых экстрактах других солей и компонентов.

Сульфат аммония доступен в достаточно чистом виде и довольно дешев даже при использовании его в больших количествах. Однако незначительное загрязнение тяжелыми металлами, особенно железом, может повредить чувствительные к ним ферменты. Перед осаждением белков солями аммония необходимо добавить в раствор какие-либо металлсвязывающие агенты, например ЭДТА. Важно отметить, что даже в том случае, когда содержание тяжелого металла в препарате соли составляет всего лишь одну часть на миллион, концентрация его биохимически активной формы в 3 *М* растворе сульфата аммония будет равна нескольким мк*М*. Количество сульфата аммония, которое нужно добавить для получения необходимой концентрации, можно подсчитать с помощью простой формулы (уравнение 3.5а). Эта формула учитывает увеличение объема при добавлении соли. Так, хотя растворимость сульфата аммония составляет 533 г·л$^{-1}$ при 20 °С, для получения насыщенного раствора к 1 л нужно добавить 761 г соли. Объем такого раствора будет равен 1,425 л, а его плотность составит 1761/1425 = 1,235 г·см$^{-3}$. Концентрацию сульфата аммония обычно выражают в процентах насыщения, допуская, что обрабатываемый раствор эквивалентен воде по способности растворять сульфат аммония. Для этого используют уравнение (3.5б).

Количество сульфата аммония в граммах, которое нужно добавить к 1 л раствора при 20 °С, чтобы из раствора с молярностью M_1 получить раствор с молярностью M_2, равно

$$\text{Количество (г)} = \frac{533\,(M_2 - M_1)}{4{,}05 - 0{,}3M_2}. \qquad (3.5а)$$

Количество сульфата аммония в граммах, которое нужно добавить к 1 л раствора при 20 °С, чтобы из раствора с насыщением S_1 % получить раствор с насыщением S_2 %, равно

$$\text{Количество (г)} = \frac{533\,(S_2 - S_1)}{100 - 0{,}3S_2}. \qquad (3.5б)$$

Обе эти формулы основаны на допущении, что раствор 100%-ного насыщения соответствует 4,05 М раствору. Следует отметить, что на практике из-за присутствия в растворе других солей и белка *истинная* растворимость сульфата аммония в образце будет несколько меньше, чем 533 $г \cdot л^{-1}$ при 20 °С. Количество необходимого сульфата аммония можно найти в приложении А в таблице I, где оно дано с интервалом в 5%. Значения для других степеней насыщения можно получить исходя из этих цифр путем интерполяции. Значение pH может быть важным при осаждении, однако в большинстве случаев при незначительном изменении pH от эксперимента к эксперименту разница оказывается несущественной. Лучше всего работать при нейтральных значениях pH (6—7,5). Сульфат аммония обладает слабым подкисляющим действием, поэтому раствор должен содержать буфер (например, фосфатный) примерно 50 мМ концентрации.

Одной из наиболее хорошо изученных систем, фракционируемых с помощью сульфата аммония, является экстракт мышц кролика. Чок и Бюхер [27] разделили экстракт на пять фракций путем осаждения сульфатом аммония; каждая фракция была обогащена определенными ферментами. Взяв за основу эту работу, можно выделить все гликолитические ферменты, а так-

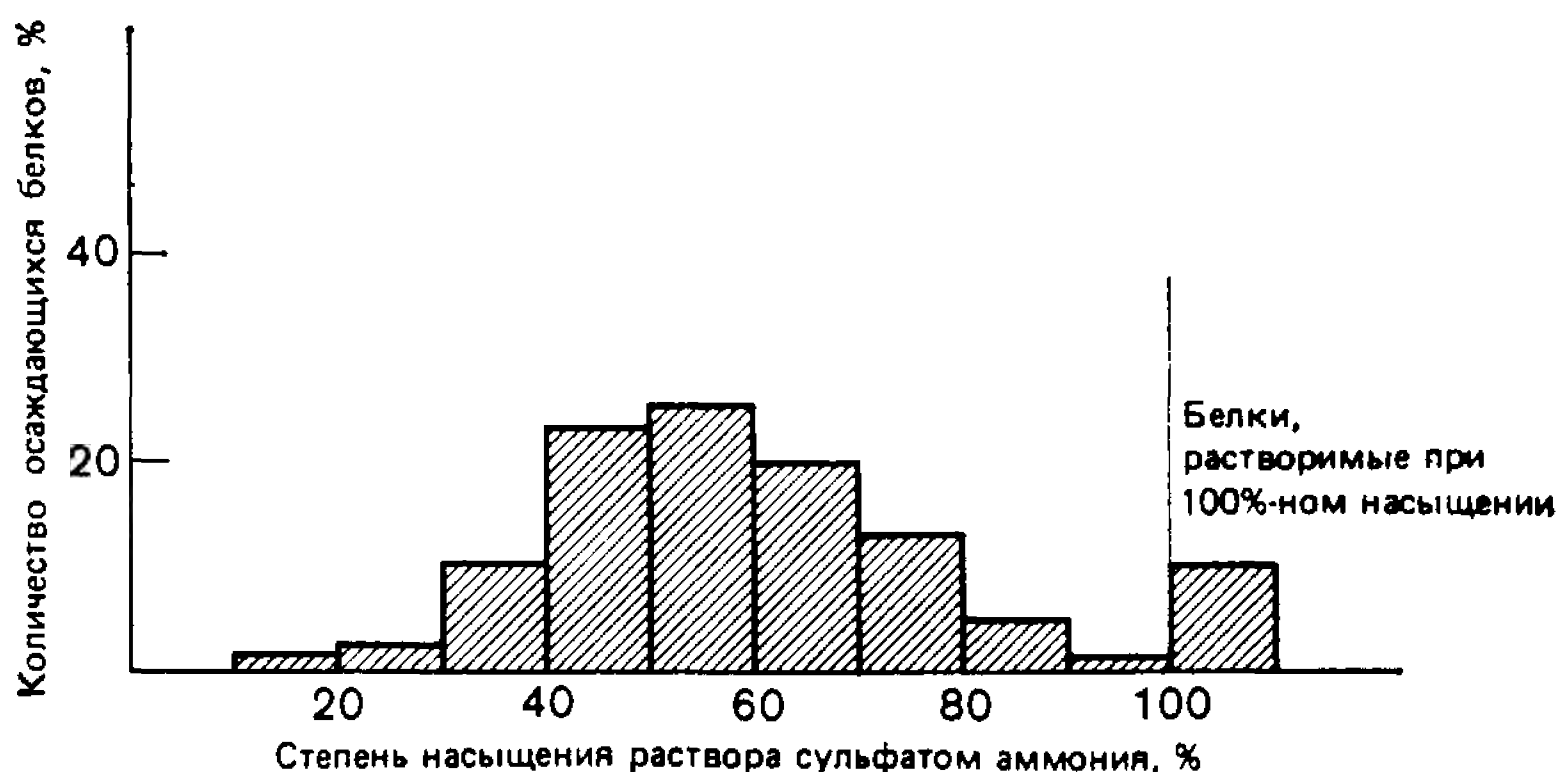


Рис. 3.8. Осаждение белков из грубого экстракта ткани при различной степени насыщения сульфатом аммония.

же и некоторые другие, разделив экстракт осаждением сульфатом аммония на четыре фракции [28].

Фракционирование сульфатом аммония имеет одно важное преимущество по сравнению практически со всеми другими методами — оно приводит к стабилизации белков. Суспензия белкового осадка или кристаллов в 2—3 М растворе сульфата аммония стабильна в течение многих лет. Это обычный метод хранения коммерческих ферментов. Высокая концентрация соли предотвращает также протеолиз и действие бактерий (разд. 6.2). В процессе очистки всегда бывает полезно иметь стадию, на которой образец можно оставить на ночь. Такой стадией может быть получение осадка в растворе сульфата аммония, как отцентрифугированного, так и неотцентрифугированного, хотя в некоторых случаях образец лучше хранить замороженным.

После того как решено использовать фракционирование с помощью сульфата аммония, необходимо определить, каким должен быть процент насыщения. При насыщении менее 25% обычно осаждаются частицы, а также агрегированные или очень

Таблица 3.2. Пробное фракционирование сульфатом аммония [29]

	Степень насыщения, %	Количество осажденного фермента, %	Количество осажденного белка, %	Степень очистки[1])
Первый опыт	0—40	4	25	
	40—60	62	22	2,8
	60—80	32	32	1,0
	80 (надосадочная жидкость)	2	21	

Вывод: При насыщении 40—60% осаждается больше фермента, чем при насыщении 60—80%; проверить область 45—70%.

Второй опыт	0—45	6	32	
	45—70	90	38	2,4
	70 (надосадочная жидкость)	4	30	

Вывод: выход хороший, но степень очистки ниже, чем в первом опыте; если чистота препарата имеет первостепенное значение, то следует испробовать концентрации в пределах 48—65%.

Третий опыт	0—48	10	35	
	48—65	75	25	3,0
	65 (надосадочная жидкость)	15	40	

[1]) Отношение удельной активности фракции к удельной активности исходного образца.

высокомолекулярные белки. На рис. 3.8 показана типичная картина распределения белка при его осаждении из грубого экстракта. В таблице 3.2 даны идеализированные результаты пробного фракционирования сульфатом аммония. Процесс фракционирования — это всегда компромисс между выходом активности и степенью очистки. Если стоимость исходного материала высока, или его трудно получить, или если поставлена цель — выделить как можно больше фермента, не заботясь о том, чтобы он был абсолютно чистым, тогда можно пожертвовать степенью очистки ради выхода. С другой стороны, если фракционирование является первой стадией работы с легко доступным материалом, то ради получения чистого фермента можно пожертвовать полнотой его выделения. Во многих случаях после фракционирования сульфатом аммония используют более сложные методы [например, ионообменную хроматографию (разд. 4.3) или аффинную адсорбционную хроматографию (разд. 4.5)]. При этом поведение нужного фермента может не зависеть от количества примесей. В таком случае часто используют грубое фракционирование сульфатом аммония, которое дает незначительную очистку, но служит этапом, необходимым для подготовки экстракта к адсорбционной хроматографии.

Перед добавлением твердого сульфата аммония его взвешивают, разбивают все комки и медленно добавляют соль к раствору при перемешивании. Первую порцию можно растворить достаточно быстро, но по мере приближения к заданному проценту насыщения последние порции соли необходимо добавлять более медленно. Растворенный воздух может выходить из раствора и вызывать вспенивание, но это не оказывает какого-либо вредного воздействия на белки; однако если вспенивание происходит в результате слишком энергичного перемешивания, то поверхностное натяжение, действующее на белки, попавшие в пузырьки, может привести к их денатурации. После растворения последней порции соли перемешивание необходимо продолжать в течение 10—30 мин до достижения полного равновесия между растворенными и агрегированными белками; затем раствор центрифугируют. Обычно достаточно центрифугировать при 10^5 *g*/мин (например, при 10 000 *g* в течение 10 мин или при 3000 *g* в течение 30 мин). При высоких концентрациях соли может понадобиться более длительное центрифугирование. Надосадочную жидкость сливают, измеряют ее объем и подсчитывают количество соли, необходимое для следующего фракционирования. Осадок растворяют в нужном буфере. Следует отметить, что объем буфера не должен превышать объем *осадка* более чем в 1—2 раза, так как этого достаточно, чтобы концентрация соли оказалась значительно ниже точки преципитации белков, присутствующих в растворе. Если весь осадок не

растворяется, то нерастворимый материал, вероятно, представляет собой денатурированные частицы и его нужно удалить центрифугированием. Белковые растворы лучше всего хранить в наиболее концентрированном виде. Это повышает стабильность белков, и, кроме того, всегда легче потом разбавить раствор, чем сконцентрировать его.

Вновь растворенный осадок содержит значительные количества сульфата аммония, который необходимо удалить перед следующей стадией очистки. Для этого обычно используют такие методы, как диализ или гель-фильтрация на «обессоливающей» колонке (разд. 1.4). Активность фермента можно определить в растворенном осадке или надосадочной жидкости, но в последнем случае нужно быть уверенным, что количество сульфата аммония, добавленное в определяемую смесь вместе с образцом, не скажется на результатах.

Определение активности в осадке нужно проводить в любом случае. Хотя потери при фракционировании сульфатом аммония обычно невелики, активность, содержащаяся в осадке, может быть меньше, чем разность между активностями в двух последовательно полученных надосадочных жидкостях.

Вместо растворения твердой соли в образце в него можно добавлять нужное количество насыщенного раствора так же, как это делается при добавлении органических растворителей (разд. 3.4). Такой прием особенно полезен, если фермент полностью осаждается при 50%-ном насыщении, так как при этом объем возрастает только в два раза. При работе в больших масштабах добавление сульфата аммония в виде раствора неприемлемо, но для выделения белков в малых количествах это вполне подходящий метод. При более высоком проценте насыщения объем раствора увеличивается еще больше, а происходящее при этом разбавление белка в свою очередь требует еще более высокой степени насыщения, чтобы осаждение было столь же эффективным. Поэтому данный метод не рекомендуется использовать при степени насыщения выше 50%.

Очень важно помнить, что соль никогда не осаждает фермент полностью, а только снижает его растворимость. Если исходная смесь содержит, скажем, 1 мг$\cdot$мл$^{-1}$ нужного фермента, то снижение растворимости до 0,1 мг$\cdot$мл$^{-1}$ означает 90%-ное осаждение фермента. Это достаточно высокий выход. С другой стороны, если исходная концентрация фермента составляет только 0,1 мг$\cdot$мл$^{-1}$, то при той же концентрации соли осаждения фермента не произойдет. Другими словами, область концентрации соли, осаждающей фермент, зависит не только от свойств самого фермента, но и от свойств других белков, присутствующих в растворе (соосаждение), а также от концентрации белка в исходном растворе.

Наконец, очень важно применение высаливания не столько для фракционирования образцов, сколько для их концентрирования. Может возникнуть необходимость в концентрировании элюата, полученного с ионообменной колонки или после гель-фильтрации. Высаливание при добавлении необходимого количества сульфата аммония для осаждения всех белков является эффективным способом концентрирования — при условии, что образец, который нужно сконцентрировать, не слишком разбавлен. Для получения раствора приблизительно 85%-ного насыщения удобно растворить 60 г сульфата аммония в 100 мл. При такой концентрации сульфата аммония немногие белки имеют растворимость выше 0,1 мг·мл$^{-1}$. Но если исходная концентрация белка в растворе ниже 1 мг·мл$^{-1}$, то перед высаливанием следует попытаться повысить ее, например с помощью ультрафильтрации (разд. 1.4).

3.4. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Общая теория

Метод осаждения белков смешивающимися с водой органическими растворителями применяется с тех самых пор, как начали заниматься очисткой белков. Особенно важную роль он играет при выделении белков в промышленных масштабах, в частности при фракционировании белков плазмы [30]. Однако в лабораторных условиях этот метод не нашел столь широкого

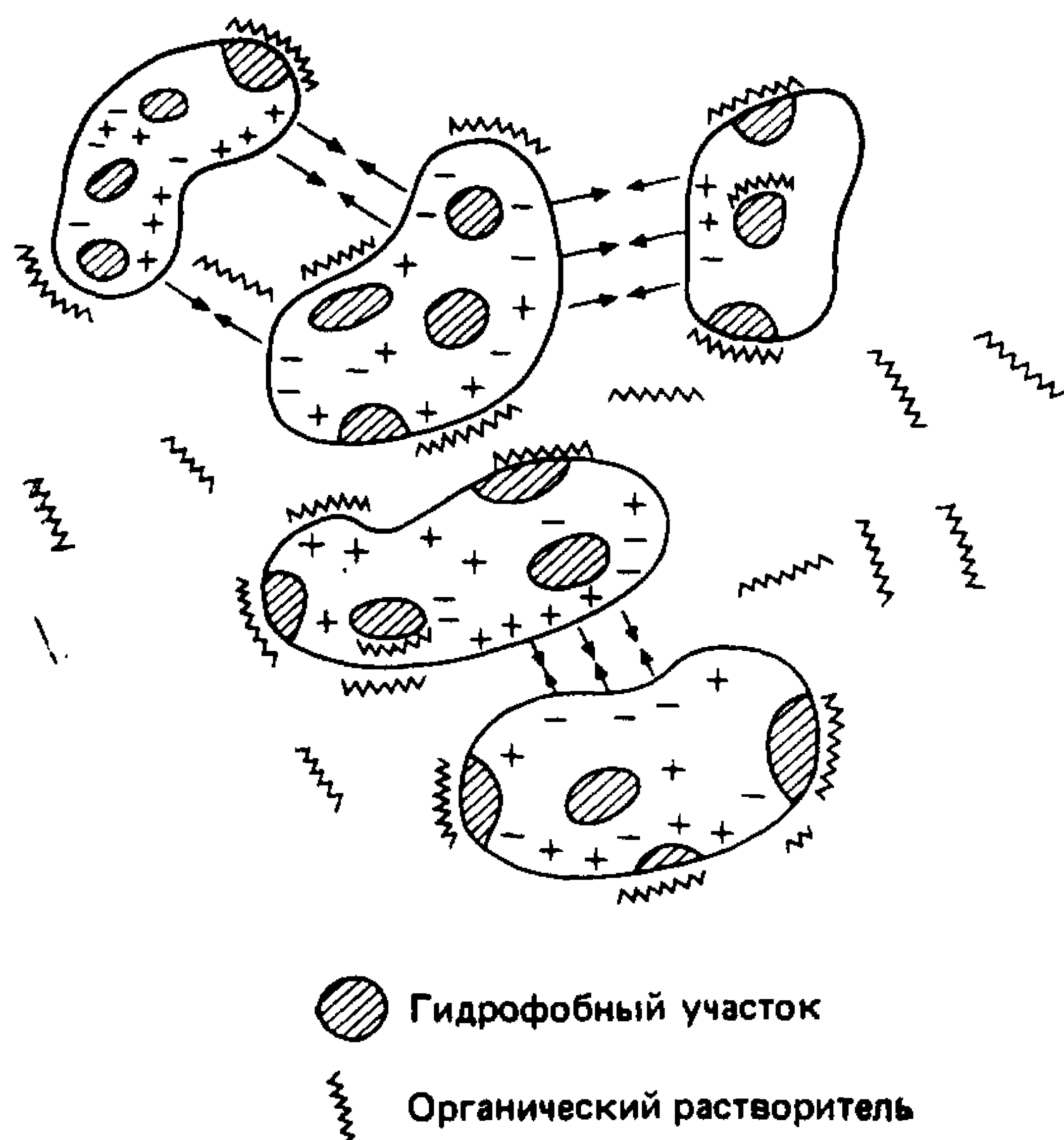


Рис. 3.9. Агрегация белков вследствие их взаимодействия в смеси воды с органическим растворителем.

применения. В сущности, он используется слишком редко, если учесть, что у него есть некоторые преимущества по сравнению с осаждением белков путем высаливания, хотя ему присущ и ряд недостатков. Поскольку этот метод основан на других принципах осаждения, он может быть использован не вместо сульфата аммония, а как дополнительная стадия очистки.

Добавление к водному экстракту, содержащему белки, таких растворителей, как этанол или ацетон, вызывает различные эффекты, которые вместе приводят к осаждению белка. Основной эффект заключается в снижении активности воды. По мере возрастания концентрации органических растворителей снижается способность воды к сольватации заряженных гидрофильных молекул фермента. Это можно объяснить снижением диэлектрической постоянной растворителя или же просто вытеснением большой массы воды и частичной иммобилизацией ее молекул вследствие гидратации молекул органического растворителя. Молекулы воды, расположенные упорядоченным образом вокруг гидрофобных участков на поверхности белка, могут быть замещены молекулами органического растворителя, что приводит к относительно более высокой «растворимости» этих участков. Некоторые сильно гидрофобные белки (обычно мембранные) могут растворяться в 100%-ном органическом растворителе. Однако суммарное действие органических растворителей на цитоплазматические и другие водорастворимые белки состоит в снижении их растворимости до уровня, при котором начинаются агрегация и осаждение.

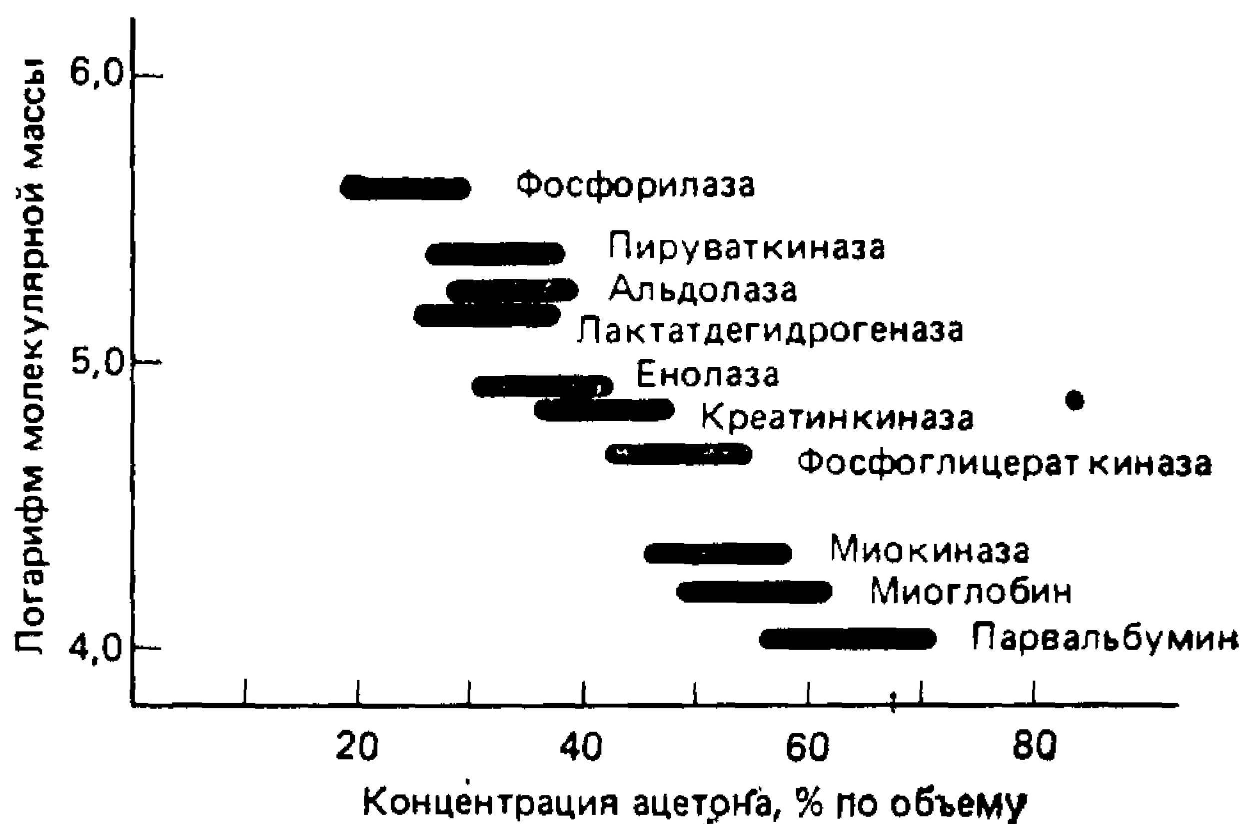


Рис. 3.10. Приблизительные области осаждения некоторых белков из экстрактов мышц различными концентрациями ацетона при 0 °С, pH 6,5, I=0,1 [29].

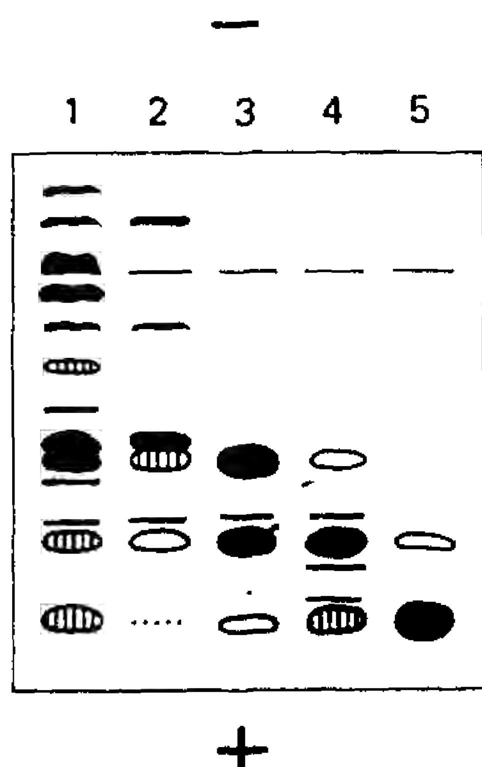


Рис. 3.11. Электрофореграмма ацетоновых фракций из экстракта мышц карпа, полученная на крахмальном геле при pH 6,5. Видно разделение парвальбуминов II, III и IV (мол. масса приблизительно равна 11 000). 1—цельный экстракт; 2, 3, 4 и 5 — фракции, полученные при концентрации (в % по объему) ацетона соответственно 55—60, 60—65, 65—70 и 70—80. Последней осаждается наиболее кислая зона, так как она больше других удалена от изоэлектрической точки (приблизительно 4,0) [29].

Основная причина агрегации белков заключается, вероятно, в электростатических и вандерваальсовых силах, сходных с силами, действующими при высаливании белков в отсутствие органического растворителя. Гидрофобные взаимодействия имеют здесь меньшее значение из-за солюбилизирующего влияния органических растворителей на неполярные участки белковой глобулы. Было установлено, что вблизи изоэлектрической точки белков осаждение происходит при более низкой концентрации органического растворителя. Это подтверждает предположение о том, что агрегация, происходящая в данном случае, сходна с агрегацией, наблюдающейся при изоэлектрическом осаждении белков. На рис. 3.9 схематически изображены молекулы белков в смеси воды с органическим растворителем; агрегация здесь происходит за счет взаимодействий между противоположно заряженными участками на поверхности белков.

Другим параметром, влияющим на осаждение белка под действием органического растворителя, является размер молекулы. При прочих равных условиях чем больше молекула, тем ниже концентрация органического растворителя, вызывающая осаждение белка. Так, если бы можно было сравнивать способность к осаждению белков, различающихся по величине молекул, но сходных по гидрофобности и изоэлектрическим точкам, то оказалось бы, что эта способность связана с размером молекул обратной зависимостью. На практике же присутствующие в данной смеси белки, различающиеся по составу и общему заряду, тем не менее хорошо подчиняются этому приблизительному правилу. Крупные молекулы агрегируют быстрее, чем мелкие, так как для них больше вероятность того, что на их поверхности находится заряженный участок, комплементарный другому белку (рис. 3.9). На рис. 3.10 и 3.11 представлены некоторые экспериментальные данные, показывающие

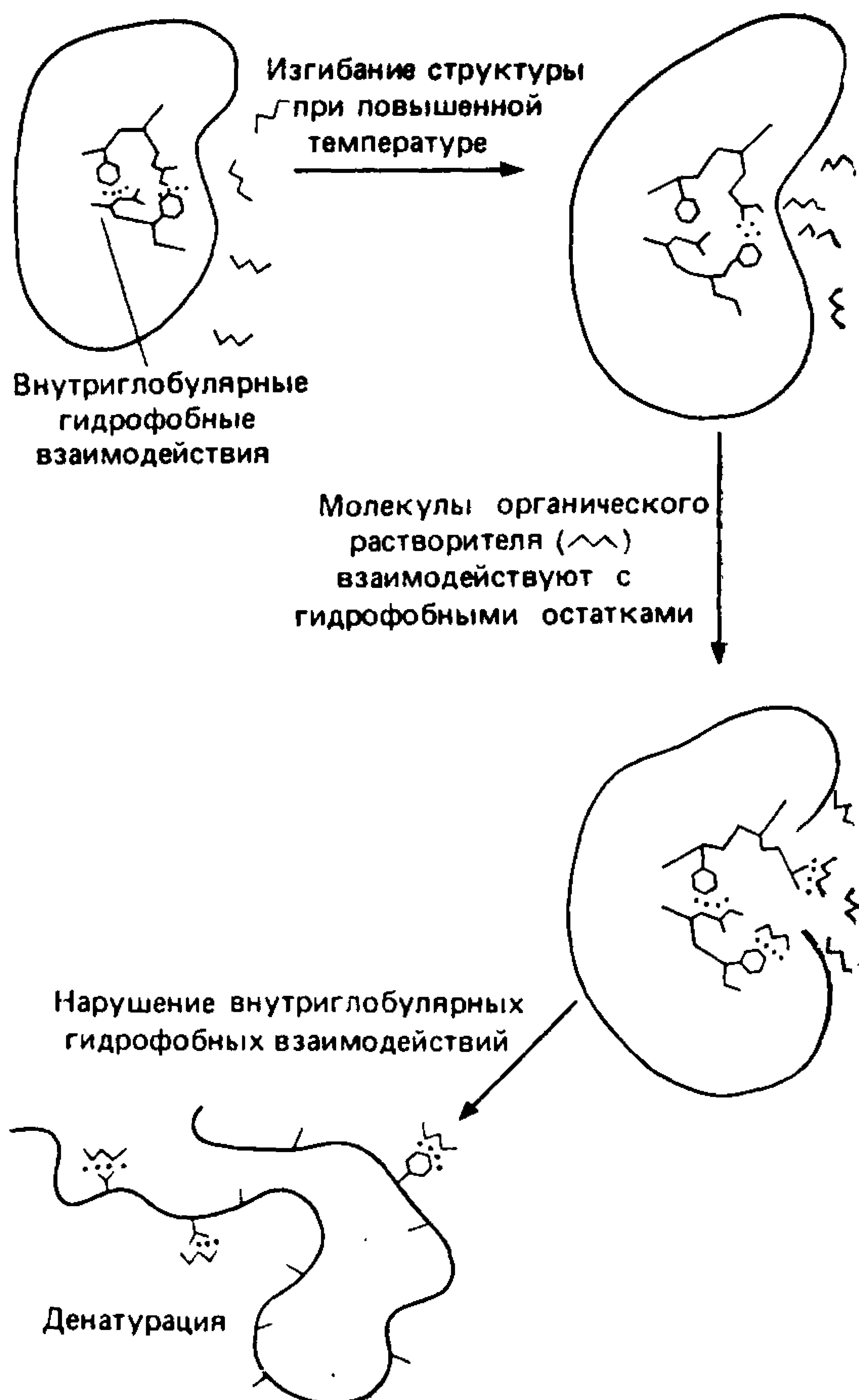


Рис. 3.12. Денатурирующее действие органических растворителей на белки.

взаимосвязь размера белковых молекул и значения изоэлектрической точки со способностью белков к осаждению [29]. В ранних исследованиях по фракционированию органическими растворителями было установлено, что для экстрактов из мышц кролика наиболее подходящим растворителем является ацетон при pH 6,5 [31]. Изоэлектрические точки основных компонентов, содержащихся в экстрактах мышц млекопитающих, лежат в области pH 6,0—7,5 (при использовании для экстракции фосфатного буфера).

Выбор растворителя

Используемый растворитель должен полностью смешиваться с водой, не реагировать с белками и обладать хорошим осаждающим действием. Два наиболее широко используемых рас-

творителя — это этанол и ацетон. Применяются также метанол, *н*-пропанол, изопропанол, диоксан, 2-метоксиэтанол (метилцеллосольв) и другие, более редкие спирты, эфиры и кетоны. Важным условием их применения является безопасность как в смысле воспламеняемости растворителя, так и токсичности его паров. По этим причинам диоксан, 2-метоксиэтанол и другие эфиры следует исключить из приведенного списка.

Одно из преимуществ фракционирования с помощью органических растворителей заключается в том, что его можно проводить при температуре ниже нуля, так как все смешивающиеся с водой растворители образуют смеси, замерзающие при температуре значительно ниже 0 °С. Это очень важное свойство, так как в ходе фракционирования необходимо поддерживать низкую температуру. При температуре выше +10 °С становится заметным денатурирующее действие органического растворителя. Денатурация связана с изменением молекулярных гидрофобных взаимодействий, стабилизирующих структуру белка. Отсутствие денатурации при низкой температуре обусловлено малой вероятностью того, что молекулы органического растворителя проникают во внутренние участки белковой глобулы и дестабилизируют ее. При более высоких температурах небольшие молекулы органических веществ проникают в поверхностные «трещины», образующиеся спонтанно в результате естественной подвижности структуры, и связываются за счет гидрофобных взаимодействий с внутриглобулярными остатками, такими, как Leu, Ile, Tyr, Phe, Val и т. д. (рис. 3.12). С повышением температуры внутренние гидрофобные взаимодействия в белковой молекуле усиливаются и начинают играть относительно более важную роль в поддержании целостности молекулы. Все это ведет к автокаталитической денатурации.

Некоторые органические растворители проявляют более сильное денатурирующее действие, чем другие. Давно установлено, что спирты с длинной цепью обладают более высокой денатурирующей способностью по сравнению с короткоцепочечными спиртами. Примеры этого приведены в разд. 3.5. Хотя этанол и используется в стандартных методах фракционирования белков плазмы [30], необходимо отметить, что эти белки (лишь немногие из них относятся к ферментам) составляют группу, характеризующуюся необычной стабильностью и переносящую условия, в которых денатурируют более чувствительные белки. Ацетон обладает менее денатурирующим действием, чем этанол, отчасти потому, что при низкой температуре требуются несколько более низкие его концентрации, чтобы получить такое же осаждение, как и при использовании этанола. Он также более летуч, что позволяет легко удалять его из растворенного осадка при пониженном давлении.

Методика проведения фракционирования

Образец, подвергаемый фракционированию, необходимо охладить до 0 °С. Чтобы достичь такой низкой температуры, нужно приготовить ледяную баню с солью или другую емкость, в которой можно поддерживать температуру ниже 0 °С. Концентрация белка может быть 5—30 мг·мл$^{-1}$, а концентрация соли не должна быть слишком высокой. При высокой концентрации соли (например, после фракционирования сульфатом аммония) электростатическая агрегация снижается и требуются более высокие концентрации органического растворителя, что увеличивает вероятность денатурации. С другой стороны, при очень низкой концентрации соли может образоваться весьма тонкая взвесь, которую трудно осадить. В идеале исходная величина ионной силы должна быть 0,05—0,2. При добавлении растворителя к воде происходит выделение тепла, как как величина ΔH^0 гидратации молекул растворителя имеет отрицательное значение. Поэтому добавление растворителя нужно производить медленно при эффективном охлаждении (для обеспечения хорошей теплопроводности используйте стеклянный, а не пластиковый контейнер; лучше даже использовать посуду из нержавеющей стали). Если фермент особенно неустойчив к действию органических растворителей, то, может быть, лучше, чтобы температура была ниже 0 °С, так как при добавлении раство-

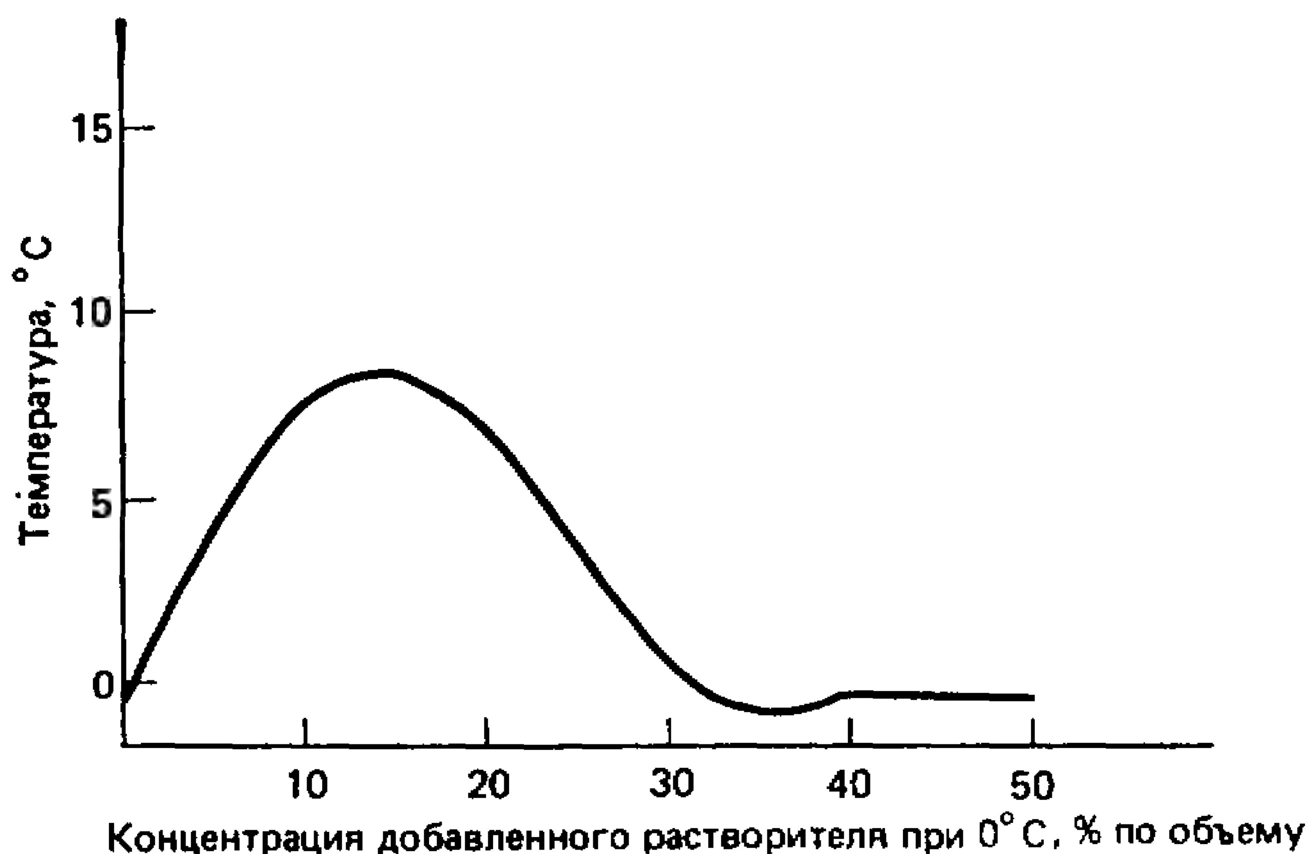


Рис. 3.13. Изменения температуры водного раствора по мере добавления к нему холодного органического растворителя при эффективном охлаждении. При достижении 10%-ной концентрации органического растворителя разогревание раствора за счет гидратации растворителя ослабевает по сравнению с внешним охлаждением. Когда концентрация органического растворителя достигает 20%, разогревание становится незначительным или совсем прекращается.

рителя точка замерзания смеси снижается. Однако большинство ферментов относительно более стабильны, и, вероятно, нет необходимости поддерживать температуру ниже 10 °С, если концентрация растворителя составляет менее 20% (по объему). После добавления нужного количества растворителя дальнейшего разогревания не происходит, и поэтому можно легко поддерживать постоянную температуру. На рис. 3.13 показана типичная температурная кривая, полученная при постепенном добавлении к водному раствору холодного (и непрерывно охлаждаемого) органического растворителя.

После добавления первой порции растворителя (ацетона или этанола), обычно до 20—30%-ной концентрации, необходимо строго поддерживать соответствующую для данного случая температуру (например, 0 °С) в течение 10—15 мин, прежде чем проводить центрифугирование в предварительно охлажденном роторе. Количество осадка в значительной степени зависит от температуры, увеличиваясь при более низкой температуре. (Редкое исключение из естественного «закона подлости», который гласит, что сто́ит что-либо одно изменить, как что-то другое тут же изменится к худшему. Снижение температуры не только уменьшает возможность денатурации, но и позволяет использовать более низкие концентрации органического растворителя.) Так как очень трудно точно поддерживать температуру ниже 0 °С, особенно во время центрифугирования, на практике для осаждения белков органическими растворителями обычно используют температуру 0 °С ± 1 °С.

Большинство ферментов осаждаются при добавлении ацетона в концентрации от 20 до 50% (по объему). Определение процентного содержания по объему не такое уж простое дело. Строго говоря, к термину «процентное содержание» следует добавить слова: «Исходя из предположения об аддитивности объемов». Так, если к 50 мл ацетона добавить 50 мл воды, то общий объем жидкости составит только 95 мл. Считать, что в этом случае концентрация ацетона составляет «50% по объему в предположении об аддитивности объемов», конечно, неверно, но по крайней мере из этого определения ясно, как производится расчет. Аналогично при смешивании этанола с водой в соотношении 50 : 50 объем изменяется на 4%. Уменьшение объема происходит за счет образования гидратированных комплексов растворителя, которые занимают меньший объем, чем составляющие их компоненты. Такое изменение объема представляет собой наибольшую разницу между объемом, получаемым при достижении нужной концентрации в один этап (например, от 0 до 50%) путем добавления равного объема растворителя, и объемом, получаемым при достижении той же концентрации в несколько этапов. Однако вряд ли это имеет какое-то сущест-

венное значение. Если в протоколе эксперимента нет точных указаний, то можно считать, что рассчитанная концентрация представляет собой «процент по объему в предположении, что объемы аддитивны».

После уравновешивания смеси при данной концентрации растворителя и определенной температуре в течение 10—15 мин осадок можно отделить центрифугированием. Плотность большинства органических растворителей, смешиваемых с водой, ниже плотности воды, поэтому седиментация агрегированного белка происходит очень быстро. При высокой концентрации растворителя и больших объемах смеси седиментация при 1 *g* (т. е. при стоянии) может быть достаточно быстрой, что позволяет декантировать большую часть надосадочной жидкости, не прибегая к центрифугированию. Однако обычно центрифугирование необходимо. Для этого вполне пригодны центрифуги большой емкости, создающие ускорение всего в несколько тысяч *g*, при условии что они имеют охлаждение. Не лишним будет еще раз подчеркнуть, что для получения воспроизводимых результатов необходимо поддерживать постоянную температуру как перед центрифугированием, так и во время него.

Далее осадок снова растворяют в *холодном* буфере подходящего состава. Если при диспергировании осадка не получается прозрачного раствора, не стоит добавлять избыток буфера — вероятно, в растворе есть денатурированный белок. Обычно легче диспергировать белковый осадок в небольшом объеме.

Использование объема буфера, превышающего объем осадка в два раза, позволяет вдвое снизить концентрацию органического растворителя; в результате должен получиться раствор, содержащий весь неденатурированный белок. Если же раствор сильно разведен, его трудно сконцентрировать вновь. Кроме того, если излишки органического растворителя удаляют выпариванием, то чем выше его исходная концентрация, тем быстрее он испаряется.

Небольшие количества органического растворителя (например, до 10% по объему) практически не оказывают влияния на результаты фракционирования другими методами. Исключение составляют методы гидрофобной хроматографии (разд. 4.8) и аффинной адсорбции, зависящие от гидрофобных взаимодействий (разд. 4.5), а также часто фракционирование с помощью высаливания. Если фермент относительно стабилен к действию растворителя, фракционирование сульфатом аммония можно проводить в присутствии растворителя. Однако концентрация соли, необходимая для осаждения белка, будет при этом, вероятно, несколько выше, что обусловлено присутствием молекул органического растворителя, препятствующих гидрофобной агрегации белка при высокой концентрации соли. Излишки рас-

творителя можно удалить, поместив раствор в бюхнеровскую колбу и выпарив его при пониженном давлении. Температуру можно поднять до 25—30 °С, погрузив колбу в процессе выпаривания в теплую воду, однако некоторые растворы сильно пенятся, вследствие чего этот метод не всегда дает удовлетворительные результаты. Наилучшим способом удаления следов органического растворителя, а также других низкомолекулярных соединений, которые могут осаждаться вместе с белком, является гель-фильтрация на колонке, подходящей для данного объема образца (табл. 1.2).

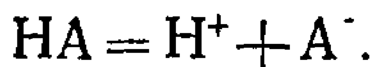
К надосадочной жидкости, полученной в результате первого осаждения органическим растворителем, добавляют еще одну порцию растворителя для осуществления следующего этапа фракционирования. Количество органического растворителя, которое необходимо добавить, можно рассчитать по формуле

$$v = \frac{1000\,(y - x)}{100 - y}\ \text{мл},$$

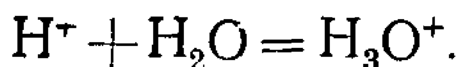
где v — объем растворителя, добавляемый к 1 л раствора, содержащего x% растворителя, чтобы получить y%-ный раствор.

В приложении А (табл. II) приведены количества чистого растворителя, которые следует добавить для получения растворов с различной концентрацией растворителя.

При 50%-ной концентрации растворителя в растворе, вероятно, останутся только белки с молекулярной массой менее 15 000. Осаждению кислых белков способствует присутствие в растворе ионов двухвалентных металлов, таких, как магний; у образовавшихся магний-белковых комплексов величина суммарного заряда меньше, что облегчает агрегацию. Наоборот, изменение pH в сторону изоэлектрической точки может привести к осаждению белка и без увеличения концентрации органического растворителя. Следует отметить, что значение pH, измеренное с помощью электрода, стандартизованного по водному буферу, обычно повышается по мере повышения концентрации органического растворителя. Это объясняется просто тем, что диссоциация кислоты складывается из двух процессов:



$$HA = H^+ + A^-.$$



$$H^+ + H_2O = H_3O^+.$$

На второй процесс влияет снижение активности воды в присутствии органического растворителя. K_a для всего процесса в целом оказывается меньше (pK_a возрастает). В качестве примера можно привести данные, полученные при выделении препарата фосфофруктокиназы из дрожжей [17]. В этой работе pH экстракта доводили до 6,0, затем добавляли ацетон до концентра-

ции 23% по объему и удаляли осадок; значение pH надосадочной жидкости при этом оказалось равным 6,4.

Неоднократно подчеркивалось, что если при фракционировании органическими растворителями температура слишком высока, то может произойти денатурация белка. Однако эта денатурация носит избирательный характер. Некоторые ферменты отличаются удивительной стабильностью. В частности, внеклеточные белки, а также ферменты термофильных организмов должны быть более устойчивыми, что объясняется условиями их природного окружения. Такие белки выдерживают воздействие органических растворителей при повышенной температуре. Использование органических растворителей для избирательной денатурации обсуждается далее в разд. 3.6.

3.5. ОСАЖДЕНИЕ БЕЛКОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ ПОЛИМЕРАМИ И ДРУГИМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Белки агрегируют без денатурации не только под действием солей и органических растворителей. Полсон и др. [32] исследовали способность различных высокомолекулярных нейтральных водорастворимых полимеров осаждать белки плазмы. Хотя некоторые из них эффективно осаждали белки, высокая вязкость растворов полимеров препятствует их практическому использованию. Единственным исключением является полиэтиленгликоль различной степени полимеризации. Растворы этого полимера при концентрации до 20% (вес/объем) имеют не очень большую вязкость, и многие компоненты плазмы осаждаются полиэтиленгликолем до того, как его концентрация достигает 20% (вес/объем). Наиболее эффективным является полиэтиленгликоль с мол. массой 4000 и выше; для осаждения белков обычно используют полиэтиленгликоль двух типов — с мол. массами около 6000 и 20 000. Поведение белков в растворах полиэтиленгликоля довольно сходно с их поведением в процессе осаждения органическими растворителями. Действительно, молекулу полиэтиленгликоля (ПЭГ) можно рассматривать как полимерный органический растворитель, хотя для получения нужной степени осаждения требуются более низкие его концентрации. При добавлении ПЭГ первым из плазмы выпадает в осадок фибриноген — довольно крупный белок, имеющий сильно асимметричные молекулы и обладающий наименьшей «растворимостью» в плазме. Затем (при нейтральном pH, близком к изоэлектрической точке) осаждаются γ-глобулины, а вслед за ними и другие компоненты. Как и в органических растворителях, растворимость белков в растворах ПЭГ возрастает по мере удаления pH от их изоэлектрической точки.

ПЭГ довольно успешно применяется для осаждения белков,

например «глобулинов», которые по своей природе обладают низкой растворимостью. Чтобы осадить другие белки, относящиеся к «альбуминам», могут потребоваться такие высокие концентрации ПЭГ, что а) вязкость и плотность раствора будут препятствовать центрифугированию и б) в сложных по составу белковых экстрактах может произойти разделение фаз на богатую белками тяжелую и более легкую фазы.

ПЭГ значительно труднее удаляется из белковой фракции, чем соль или органический растворитель. Из-за его полимерной природы он очень медленно диализуется. Разделение на обычной колонке с сефадексом G-25 также не дает хороших результатов, особенно в случае ПЭГ с мол. массой 20 000. Тем не менее остаточные низкие концентрации ПЭГ не мешают проведению многих процедур — высаливание, ионообменную и аффинную хроматографии или гель-фильтрацию можно проводить, не удаляя предварительно ПЭГ.

При очистке белков, особенно в промышленности, используют также заряженные полимеры (полиэлектролиты) [30, 33]. Они привлекательны своей дешевизной, а также тем, что при их применении не возникает трудностей, связанных с удалением отходов, поскольку осаждение белков происходит при очень низких концентрациях полимеров — 0,05—0,1 (вес/объем). Использование заряженных полимеров ограничено только специфическими случаями, что обусловлено способом осаждения белков. Электростатические комплексы между солями полиакриловой кислоты и положительно заряженными белками образуются при низких значениях pH, обычно в пределах от 3 до 6. Многие ферменты не выдерживают таких низких значений pH. Более того, величина положительного заряда многих ферментов мала даже при значениях pH, соответствующих нижней границе указанной области. Стернберг и Хершберг [33] описали осаждение различных белков как линейными, так и поперечно-сшитыми полиакрилатами. Оснóвные белки, такие, как лизоцим, цитохромы, протамины и трипсин, осаждались хорошо, хотя при pH 3,5 осаждался также и пепсин, отрицательно заряженный при этом pH. Вполне вероятно, что положительно заряженные полимеры, подобные ДЭАЭ-декстрану, будут эффективными осадителями кислых белков при более высоких значениях pH.

Среди других осадителей следует назвать соли каприловой кислоты (*н*-октановой кислоты) и риванол (2-этокси-6,9-диаминоакридинлактат), которые применяются в основном для фракционирования белков плазмы [30]. Вероятно, существует огромное множество других органических соединений, имеющих как гидрофобные, так и полярные свойства. Они также могут использоваться для осаждения, но способы их применения практически не изучены.

3.6. ОСАЖДЕНИЕ ВСЛЕДСТВИЕ ИЗБИРАТЕЛЬНОЙ ДЕНАТУРАЦИИ

Основные принципы

На всем протяжении этой книги неоднократно подчеркивается, что во избежание денатурации белков следует использовать мягкие способы их обработки. Существует целый ряд очень устойчивых ферментов, выдерживающих экстремальные условия окружающей среды. Эту исключительно высокую стабильность можно использовать, подвергая неочищенный препарат воздействию таких условий. При этом ненужные белки денатурируют и выпадают из раствора в осадок. В процессе денатурации происходит разрушение третичной структуры белковой молекулы и образуются неупорядоченные полипептидные цепи. В растворе они взаимодействуют между собой и агрегируют. Агрегация происходит под действием физических сил и в некоторой степени в результате химических взаимодействий через образование —S—S-связей. Тем не менее при низких концентрациях солей и значениях pH, далеких от изоэлектрической точки, денатурированные белки могут находиться в полностью растворимом состоянии и осаждаться только при достижении определенного значения pH. Растворимость денатурированных белков может быть обусловлена силами отталкивания между отдельными заряженными пептидными цепями. По мере приближения pH к изоэлектрической точке белки могут претерпевать агрегацию, которой способствует также высокая концентрация соли, снижающая внутримолекулярные силы отталкивания.

Цель избирательной денатурации состоит в создании таких условий, при которых нужный фермент или совсем не денатурирует, или же потери его составляют не более 10—20%, тогда как множество других компонентов смеси денатурирует и в основном осаждается в результате проведенной обработки. Для избирательной денатурации используют преимущественно 1) температуру, 2) pH и 3) органические растворители. Эти три способа воздействия обычно взаимосвязаны, поскольку денатурация под действием температуры в большой степени зависит от значений pH, и наоборот. При денатурации органическими растворителями необходимо тщательно подбирать температуру, pH и величину ионной силы. Ионная сила может несколько изменять влияние температуры и pH, особенно если сравнивать поведение белков при низкой ионной силе (от 0,01 до 0,1) с их поведением при высокой концентрации соли, например в 1 М растворе сульфата аммония. Эти три типа денатурации рассматриваются ниже.

Денатурация под действием температуры

Тепловую денатурацию белка можно представить как реакцию первого порядка с константой скорости, подчиняющейся обычным законам термодинамики. Так, константа скорости $k_{ден}$ связана с температурой следующим уравнением:

$$\frac{d \ln k_{ден}}{dT} = \frac{E_{акт}}{RT^2},$$

где $E_{акт}$ — энергия активации, равная $\Delta H^{\ne} + RT$, а $\Delta H^{\ne}$ — энтальпия активации.

Большая величина $E_{акт}(\Delta H^{\ne})$ в приведенном уравнении — это именно то, что отличает тепловую денатурацию белков от обычных химических процессов. Поэтому с изменением температуры скорость денатурации изменяется очень быстро. Величину $\Delta G^{\ne}$ можно рассчитать на основе теории абсолютных скоростей реакций. При скорости денатурации в пределах 10^{-4}—10^{-2} $с^{-1}$ величина $\Delta G^{\ne}$ составляет около 80 кДж×моль$^{-1}$. Так как $\Delta H^{\ne} = \Delta G^{\ne} + T\Delta S^{\ne}$, а величина $\Delta H^{\ne}$ обычно лежит в пределах 300—500 кДж·моль$^{-1}$, из этого следует, что $\Delta S^{\ne}$ имеет необычно большую величину, лежащую между 200 и 1000 Дж·град$^{-1}$×моль$^{-1}$. Этот факт имеет очень простое объяснение. В начале денатурации происходит разрыв множества связей, значительные конформационные перестройки белка и высвобождение ассоциированных молекул растворителя, что сопровождается увеличением энтропии, т. е. возрастанием степени неупорядоченности. Величина ΔS^0 для процесса денатурации в целом, при полной неупорядоченности полипептидных цепей, может составлять несколько тысяч Дж·град$^{-1}$·моль$^{-1}$. Процесс денатурации может включать несколько стадий, идущих по различным альтернативным путям, однако для описания всего процесса в целом с точки зрения термодинамики необходимо знать только величину энергии активации самой медленной стадии. Такой стадией обычно является первая стадия процесса.

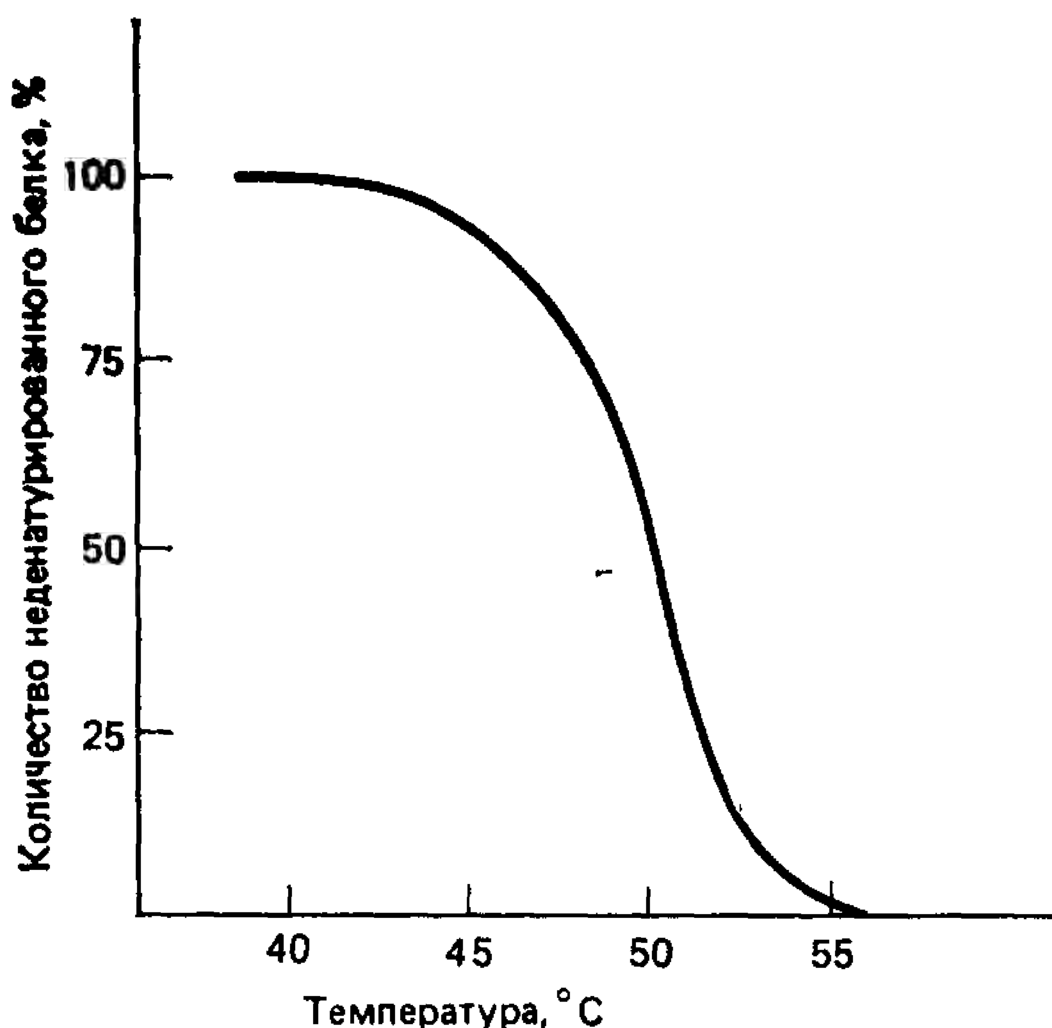


Рис. 3.14. Теоретическая кривая, показывающая количество белка, оставшегося неденатурированным после 10-мин инкубации. $E_{акт}$ = 400 кДж·моль$^{-1}$; 50%-ная денатурация происходит при 50 °С. Предполагается, что процесс необратим.

На рис. 3.14 представлена теоретическая кривая, позволяющая определить количество белка, денатурировавшего за 10 мин при данной температуре. Кривая построена в предположении, что $E_{акт}=400$ кДж$\times$ $\times$моль$^{-1}$ и что 50%-ная денатурация наступает через 10 мин при 50 °С. Следует отметить, что при температуре лишь на 5 °С выше температуры, соответствующей 50%-ной денатурации, сохраняется не более 1% исходной активности, а при температуре на 5 °С ниже указанной утрачивается только 8% активности.

Разные белки имеют неодинаковую величину $E_{акт}$, и, следовательно, средние точки их кривых денатурации (а также форма кривых) сильно различаются. Поэтому можно подобрать температуру, при которой один белок полностью денатурирует, тогда как другой белок более чем на 95% остается интактным. В группе белков, показанной на рис. 3.15, каждый белок имеет собственную кривую денатурации. Если в этом случае попытаться выделить белок D путем нагревания смеси до 50 °С в течение 10 мин, то белки А и В денатурируют практически полностью, а белок С — лишь в незначительной степени. Белок D сохраняется на 90%, тогда как белки Е и F совсем не подвергаются денатурации. В зависимости от соотношения данных белков в обрабатываемой смеси этот этап может иметь определенный смысл, особенно если другим способом трудно отделить А или В от D.

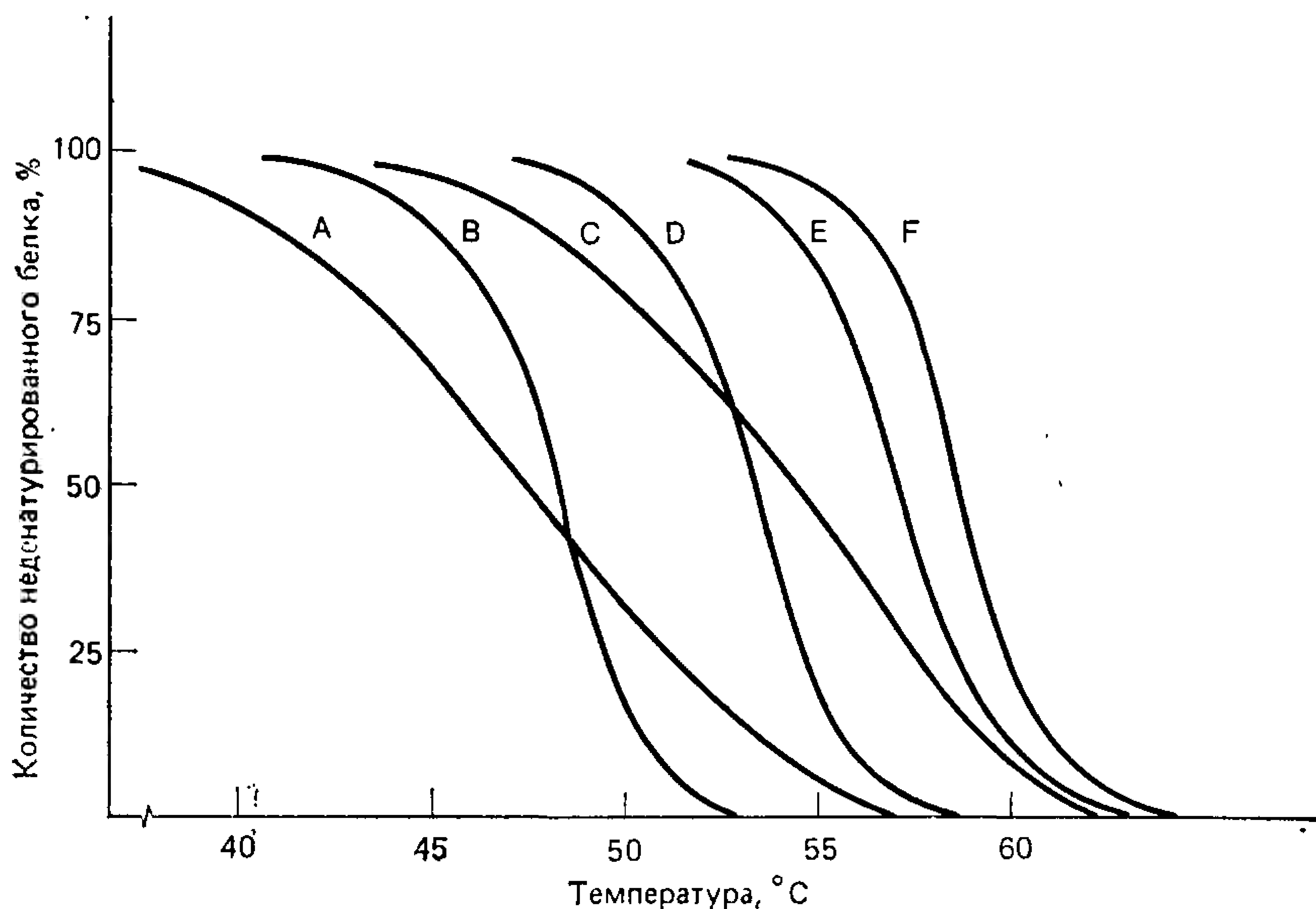


Рис. 3.15. Возможные кривые денатурации для набора белков. F — самый устойчивый к нагреванию белок; А и В — наименее устойчивые белки (см. текст).

Так же как и в случае многих других эмпирических методов фракционирования, весьма маловероятно, чтобы исследователь, применяющий тепловую денатурацию белков, имел хоть какое-то представление о поведении многих, если не всех, белков, присутствующих в смеси, не говоря уж о таких подробных сведениях, которые даны на рис. 3.15. Однако о поведении определенного интересующего иследователя фермента можно судить, нагревая небольшие пробы при различных температурах с интервалами в 5 °C. Время инкубации важно только для получения воспроизводимых результатов; инкубация проб в течение 1 или 60 мин даст кривые одинаковой *формы*, но сдвинутые по оси температур. Тем не менее следует учитывать, что если инкубация в течение 1 мин очень удобна при работе с объемом 1 мл, то почти невозможно за такое короткое время нагреть и быстро охладить большой объем жидкости. Во время нагревания раствора до нужной температуры и последующего ее снижения происходит дальнейшая денатурация.

Говоря о тепловой денатурации, важно обратить внимание на возможность протеолиза. Протеазы, как и другие ферменты, активируются при повышении температуры. Они обычно довольно стабильны, так что даже в том случае, когда нужный фермент сохраняет активность, вполне может произойти частичное расщепление белка или его небольшая модификация, что неблагоприятно скажется на качестве препарата. Именно по этой причине предпочтительно проводить нагревание в присутствии сульфата аммония (несмотря на то что под влиянием соли белки могут стабилизироваться настолько, что для их денатурации потребуется более высокая температура), поскольку высокие концентрации соли в значительной мере ингибируют протеолиз. Есть также примеры стабилизации фермента его субстратом, однако присутствие субстрата может также и дестабилизировать фермент.

Для получения воспроизводимых результатов необходимо тщательно контролировать состав буфера, содержащего подвергаемый тепловой обработке образец. Температурная кривая денатурации должна быть воспроизводимой. Помимо всего прочего, необходимо точно знать pH раствора. Как показано в следующем подразделе, незначительное изменение pH может быть причиной существенной денатурации белка.

Пробы на тепловую денатурацию следует производить при различных значениях pH. Цель в этом случае заключается в том, чтобы получить максимальное осаждение ненужных белков при заданной, например 90%-ной, степени сохранения активности фермента. Используя экстремальные значения pH, этот результат можно получить при более низких температурах. Теперь этот процесс получил название pH-денатурации.

Денатурация путем изменения pH

Чем больше отличается pH среды от физиологических значений pH для данного фермента, тем менее стабильным оказывается фермент. Однако следует отметить, что это не обязательно происходит при значениях pH, отличных от нейтральных. Например, пепсин достаточно стабилен и имеет нормальную активность при pH 1—2, но быстро денатурирует при pH 7 и выше. Оптимальная стабильность фермента не всегда наблюдается при значении pH, оптимальном для его функционирования, а оптимум pH часто не совпадает с физиологической областью pH. Последнее обусловлено тем, что условия эксперимента, при которых фермент насыщен субстратом, не обязательно соответствуют физиологическим условиям. Тем не менее предполагается, что фермент наиболее стабилен при физиологических или близких к ним значениях pH.

При экстремальных значениях pH происходит денатурация, так как в этих условиях некоторые участки белковой молекулы приобретают большее число зарядов одного знака, что приводит к отталкиванию между ними, или, возможно, наоборот, эти участки теряют заряды, обеспечивающие притяжение меж-

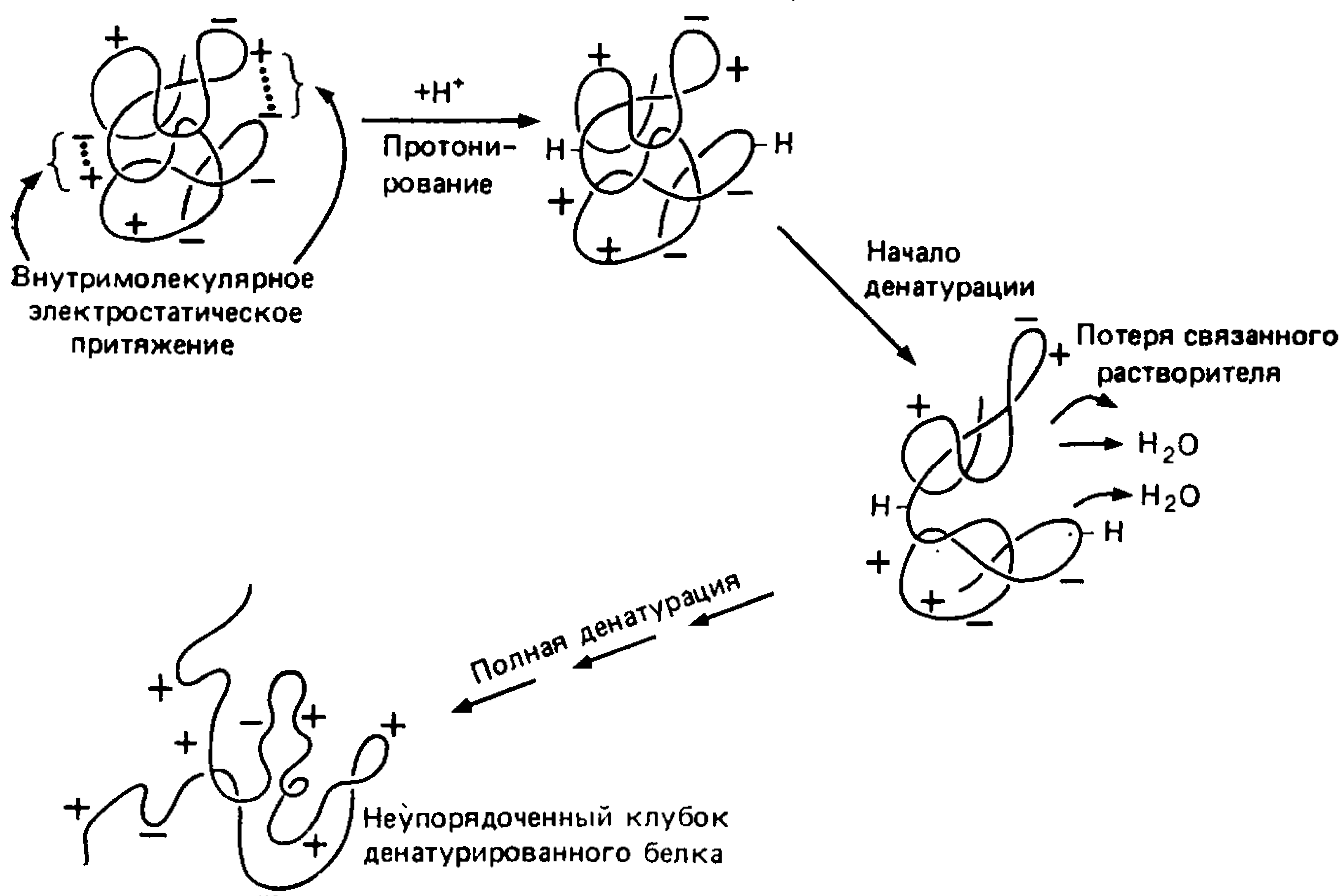


Рис. 3.16. Электростатические силы, действующие внутри белковой молекулы, ослабевают в результате протонирования, что приводит к разворачиванию молекулы и к полной денатурации.

ду отдельными участками и тем самым стабилизирующие структуру молекулы (рис. 3.16). Значение pH, при котором сохраняется наибольшая стабильность фермента, не обязательно соответствует изоэлектрической точке. Изоэлектрическая точка большинства бактериальных белков лежит в пределах pH 4—5, но именно в этих условиях они не стабильны. Дело в том, что в клетке они существуют при pH 6—7. Однако чувствительные к pH участки молекулы, показанные на рис. 3.16, могут находиться в «изоэлектрической» точке при физиологическом значении pH.

Скорость денатурации в кислых или щелочных условиях не совпадает со скоростью стадии протонирования, показанной на рис. 3.16. Протонирование и депротонирование заряженных групп происходят практически мгновенно. Скорость всего процесса определяется стадией разворачивания глобулы. Последний процесс протекает, в сущности, так же, как и при «тепловой» денатурации. Таким образом, температура — это очень важный фактор. При экстремальных значениях pH температура в области 0—10 °С может оказывать более сильное денатурирующее воздействие, чем в области 50—60 °С. Так как значительные изменения могут происходить даже при изменении температуры всего на несколько градусов, pH-денатурация должна проводиться при тщательно подобранной температуре. Поскольку pH можно быстро снизить до требуемой величины и вновь повысить (или, наоборот, повысить его и снова снизить), не возникает трудностей, обусловленных медленным приближением к выбранным условиям при проведении этой процедуры в больших масштабах. Кроме того, pH следует доводить до нужного значения подходящим основанием или кислотой (см. разд. 6.1). Необходимо по возможности избегать сильных кислот и щелочей. В области pH 5—8,5 можно использовать трис и уксусную кислоту; более сильные кислоты и щелочи нужны только за пределами этих значений pH. Молочной кислотой можно доводить pH приблизительно до 4,0, для более низких значений может потребоваться фосфорная или даже серная кислота. Если фермент стабилен при pH 2, мало вероятно, что кратковременный контакт с каплей сильной кислоты повредит именно этому ферменту, а не белку, денатурация которого происходит при pH 5. Для создания высоких значений pH используют диэтаноламин (до pH 9) или карбонат натрия (до pH 10,5); для доведения pH до 11 и выше применяют гидроокиси калия и натрия. Вполне вероятно, что в области этих экстремальных значений pH существенная часть денатурированных белков остается в растворе даже при средней концентрации соли. Но при последующем доведении значения pH до нейтрального денатурированные белки обычно осаждаются. Рекоменду-

ется после нейтрализации провести короткую инкубацию смеси при 25—30 °С, для того чтобы перед центрифугированием произошла полная агрегация денатурированных белков.

Денатурация органическими растворителями

В разд. 3.4 описано использование органических растворителей для осаждения белков при низких температурах. Чтобы избежать денатурации белков, температура поддерживается около 0 °С. В этом разделе речь идет о применении органических растворителей для денатурации. При этом обычно используют температуру от 20 до 30 °С или даже выше; концентрация же органического растворителя обычно ниже, чем это требуется для осаждения нативных белков.

В основе принципа лежит разная чувствительность белков к воздействию органических растворителей. Некоторые белки удивительно стабильны, и это их свойство можно использовать, подвергая денатурации другие, менее стабильные белки. В качестве примера можно назвать креатинкиназу из мышц кролика, стабильную в щелочной среде при концентрации этанола до 60% (по объему) и температуре 25 °С; это свойство использова-

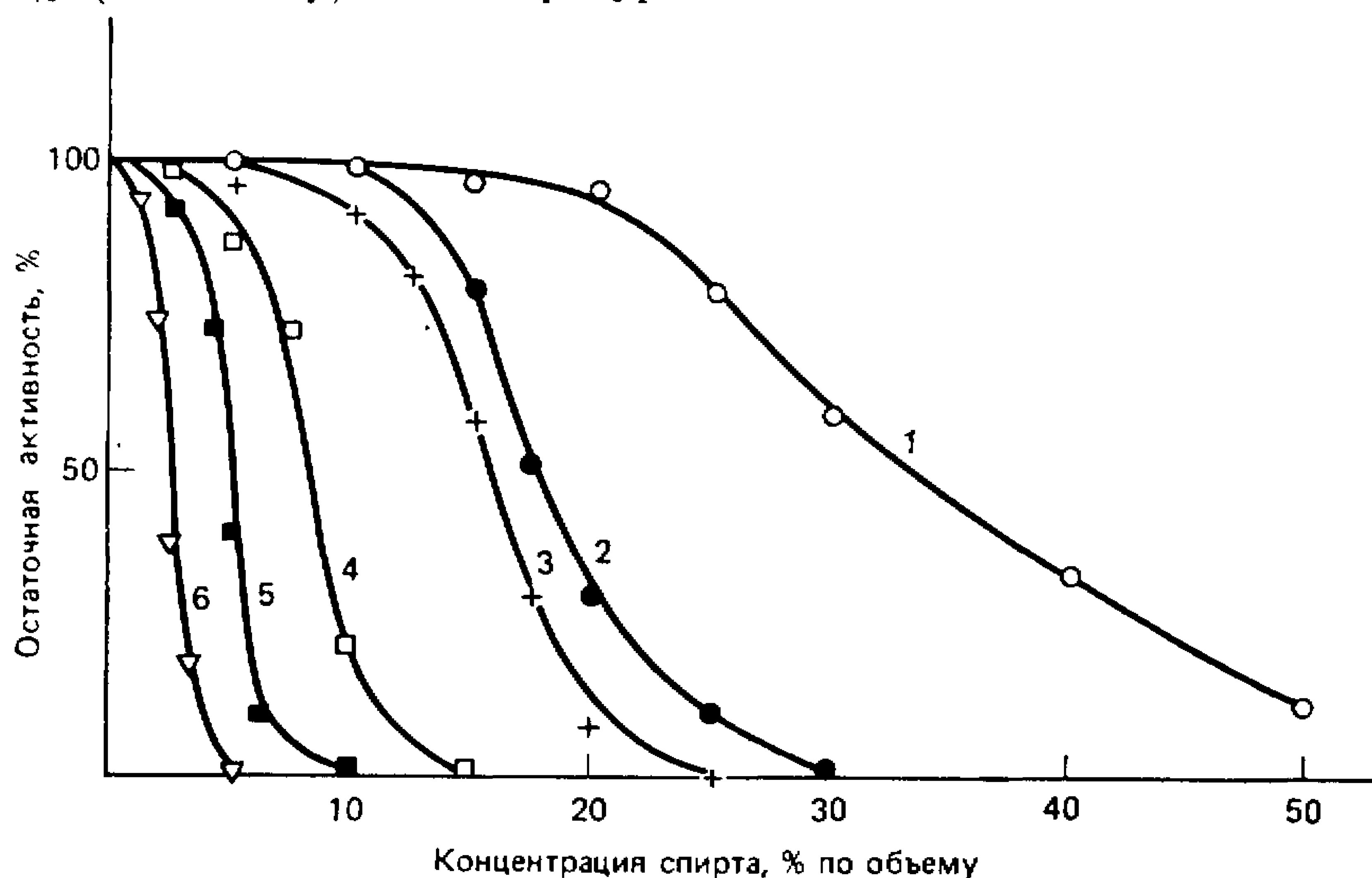


Рис. 3.17. Денатурация глицеральдегидфосфатдегидрогеназы дрожжей под действием различных спиртов. Фермент в концентрации 2 мг·мл$^{-1}$ инкубировали при 30 °С в течение 30 мин, охлаждали и удаляли осадок центрифугированием. В надосадочной жидкости определяли оставшуюся ферментативную активность. Обозначения: *1* — метанол; *2* — этанол; *3* — пропан-2-ол; *4* — пропан-1-ол; *5* — бутан-1-ол; *6* — пентан-1-ол. (Неопубликованные результаты автора.)

ли для проведения одной из стадий первоначального способа очистки этого фермента [34]. Алкогольдегидрогеназу дрожжей можно очень легко очистить после предварительной обработки экстракта 33%-ным (по объему) этанолом при 25 °C [35].

Было исследовано действие спиртов на глицеральдегидфосфатдегидрогеназу дрожжей (неопубликованные данные). Выяснилось, что чем длиннее алифатическая цепь использованного спирта, тем более сильным денатурирующим действием он обладает (рис. 3.17). Концентрация нормального спирта, необходимого для достижения 50%-ной денатурации за время 30-минутной инкубации при 30 °C, снижается в 2 раза при удлинении цепи спирта на одну метиленовую группу. Так, процентная концентрация метанола, этанола, пропан-1-ола, бутан-1-ола, пентан-1-ола, необходимая для денатурации, равна соответственно 34, 17, 8,5, 4,2 и 2,2. Ряд не был продолжен далее из-за того, что спирты с более длинной цепью плохо смешиваются с водой. Спирты с разветвленной цепью обладают меньшим денатурирующим действием (и лучше смешиваются с водой), откуда следует, что важной характеристикой денатурирующих свойств спирта является длина его алифатической цепи. Ацетон дает результаты, сходные с результатами, полученными при обработке этанолом. Итак, чтобы избежать денатурации при осаждении органическими растворителями, лучше использовать метанол.

Для денатурации органическим растворителем необходимо очень тщательно подбирать pH и температурный режим, так как эти три фактора оказывают совместное действие на белки. Поскольку существует множество различных вариантов, практически невозможно добиться идеальных условий проведения процесса, т. е. таких, при которых максимальное сохранение активности нужного фермента сочеталось бы с максимальным разрушением других белков. С другой стороны, для подбора условий, близких к оптимальным, можно провести много пробных тестов за короткое время с малыми объемами образца.

Часто приводимым примером осаждения белка органическим растворителем, но на этот раз не смешивающимся с водой, является денатурация гемоглобина хлороформом (ср. [7] и, например [36]). Очистка ферментов эритроцитов осложняется тем, что более 90% общего белка эритроцитов составляет гемоглобин. Встряхивание гемолизата со смесью этанол — хлороформ приводит к полной денатурации гемоглобина. Незначительное количество хлороформа смешивается с водной фазой и оказывает сильное специфическое денатурирующее действие на молекулы гемоглобина. Таким образом, первой стадией выделения эритроцитарного фермента часто служит обработка гемолизата хлороформом, что приводит к удалению основного загрязняющего белка — гемоглобина.

ГЛАВА 4

РАЗДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ПУТЕМ АДСОРБЦИИ

Белки обычно избирательно адсорбируются на твердых фазах самых разных типов. Поэтому адсорбционные методы, особенно колоночная хроматография, широко используются для разделения белков. Применение таких методов часто позволяет получить наибольшую степень очистки белков, что в случае ферментов означает максимально возможное повышение их удельной активности. Хотя колоночная хроматография служит идеальным способом оптимального разделения белков, не следует забывать и о методах адсорбции «в объеме», так как это очень быстрые и потому весьма полезные методы, когда время имеет первостепенное значение (см. также гл. 7). Важнейшими адсорбентами белков являются ионообменники, фосфат кальция (в виде геля или в кристаллической форме) и разнообразные аффинные адсорбенты, созданные для ферментов определенных типов. Все эти вопросы вслед за общим введением в теорию адсорбционной хроматографии обсуждаются в данной главе применительно к выделению белков.

4.1. ТЕОРИЯ ХРОМАТОГРАФИИ БЕЛКОВ

Теория хроматографии была разработана для низкомолекулярных соединений, и многие ее понятия и принципы не всегда подходят для описания взаимодействий белков и их поведения на адсорбентах. Среди особенностей, характерных для разделения высокомолекулярных полимеров, следует отметить такие, как ситовой эффект матрицы, большую разницу в силах взаимодействия белка с различными частями адсорбента и нередко высокую адсорбционную емкость адсорбентов (в $г \cdot см^{-3}$, хотя в молях она имеет обманчиво низкую величину). Биохимики привыкли воспринимать молекулярные взаимодействия в терминах констант диссоциации, которые часто можно соотнести с величинами $K_м$ в ферментативной кинетике. Применяя ту же концепцию констант диссоциации к процессу взаимодействия между белком и адсорбентом, можно разработать простую тео-

рию хроматографии белков; это особенно полезно при описании аффинных методов.

Требования к белковым адсорбентам значительно отличаются от требований, предъявляемых к адсорбентам низкомолекулярных соединений. Структура адсорбента должна быть рыхлой, с тем чтобы белок мог проникнуть внутрь частиц и достичь центров связывания. Если же адсорбент имеет более плотную структуру, то для связывания с белком доступно лишь небольшое число центров связывания на поверхности частицы, и емкость адсорбента значительно снижается. Кроме того, адсорбент по своей природе не должен оказывать вредного влияния на белки. Основной материал матрицы не должен сильно взаимодействовать с белком — адсорбционная способность обычно создается путем присоединения заместителей к предположительно инертной основе. Оба этих фактора делают стандартные типы ионообменных адсорбентов низкомолекулярных соединений неприемлемыми для работы с белками. Замещенные полистирольные смолы с большим числом сшивок не пропускают белки внутрь частиц. На их поверхности есть как гидрофобные, так и ионные группы, которые связываются с белком и затрудняют его элюцию. При большой плотности заряженных групп белок может связаться с адсорбентом практически необратимо. Считается, что сильно кислые заместители, например сульфогруппы, или сильно оснóвные вредны, однако это терминологическая путаница: заряженная форма, используемая в ионном обмене, является сопряженным слабым основанием (например, сульфогруппы) или слабой кислотой (например, четвертичное аммониевое основание).

Первыми материалами, успешно использованными в колоночной хроматографии белков, были ионообменники на основе целлюлозы, разработанные Петерсоном и Собером [37]. Для сорбции из объема применялись также многие другие адсорбенты, но только некоторые из них пригодны для работы на колонке из-за плохих характеристик потока. Обработанный должным образом порошок целлюлозы приобретает пористую структуру, позволяющую белкам проникать внутрь частиц. Более того, модификация целлюлозы заряженными группами увеличивает и стабилизирует пористость структуры в результате взаимного отталкивания зарядов. Такие материалы оказались идеальными для ионообменной хроматографии белков, и до сих пор это наиболее широко используемые адсорбенты. Другие важные адсорбенты, применяемые для работы на колонке, также представляют собой главным образом адсорбенты на основе биополимеров — декстранов или агароз. Сюда входят многие истинно аффинные и модифицированные красителями «псевдоаффинные» адсорбенты, гидрофобные адсорбенты и некоторые ионообмен-

ные материалы. Единственным исключением является кристаллическая форма фосфата кальция (гидроксилапатит), который можно использовать для колоночной хроматографии; более же традиционный кальцийфосфатный гель не годится для набивки колонок. Теория хроматографии, изложенная ниже, применима ко всем этим адсорбентам, используемым как в колоночном варианте, так и при адсорбции «из объема».

Константа диссоциации при взаимодействии белка с матрицей

При взаимодействии белка с адсорбентом редко возникает какое-то одно соединение, подобное тому, которое образуется при связывании фермента с его субстратом. На носителе имеется множество центров связывания различной конфигурации для белков, которые сами могут иметь олигомерную четвертичную структуру и потому способны связываться с носителем в нескольких местах на его поверхности. На рис. 4.1 представлено плоскостное изображение того, каким образом молекулы белка могут распределяться в адсорбенте с беспорядочным расположением центров связывания. Белок может взаимодействовать с двумя, тремя или большим числом центров, что приводит к полидисперсности сил взаимодействия. Знаки «+» на рисунке означают, что это анионообменник. Однако на диаграмме можно представить и многие другие типы адсорбентов. Поэтому

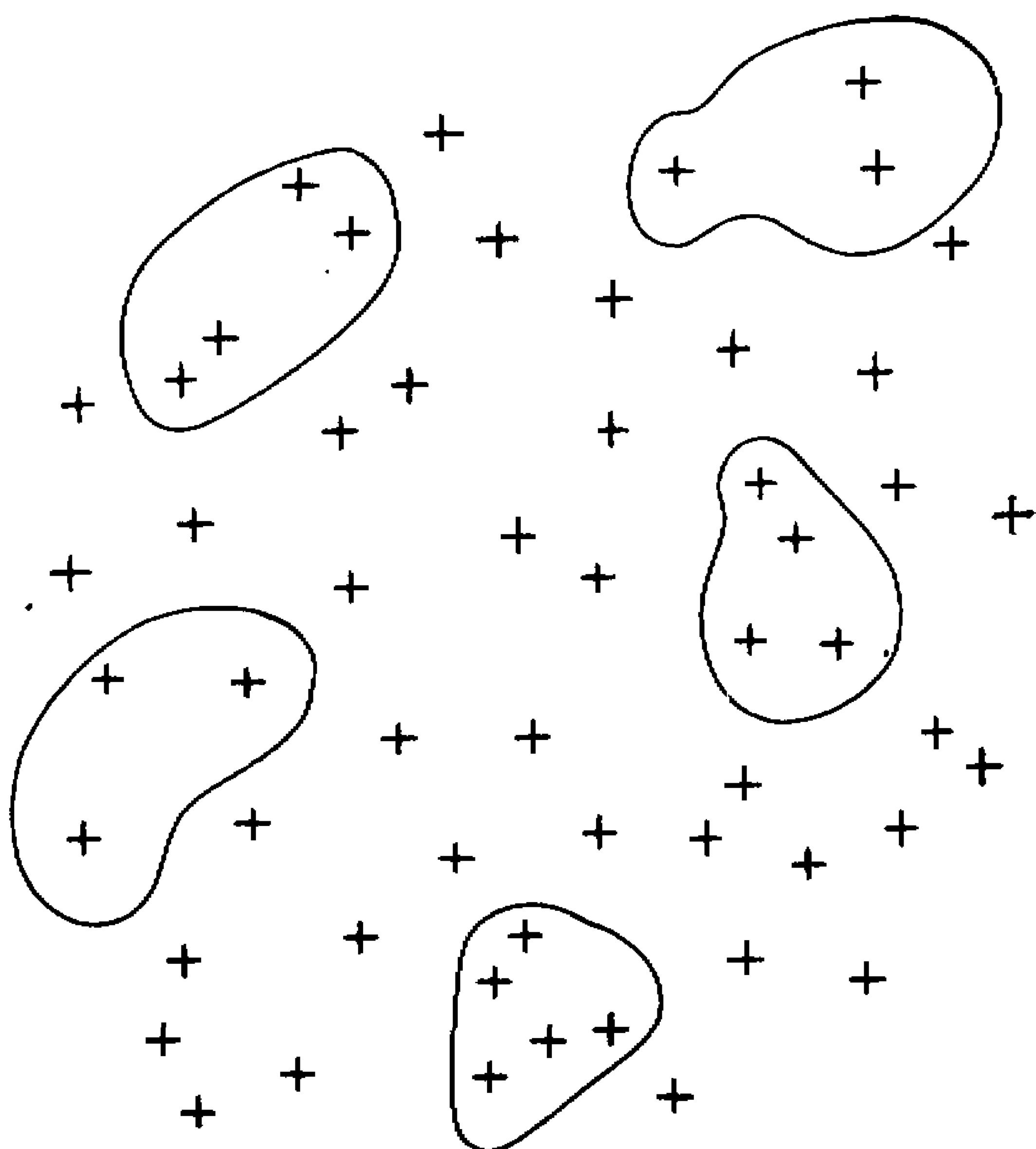


Рис. 4.1. Двумерное изображение полидисперсности адсорбционных центров в ионообменнике. Показано, что молекулы белка могут взаимодействовать с тремя, четырьмя и пятью положительными зарядами (+) на ионообменнике. Заряженные группы распределены беспорядочно или гетеродисперсно из-за негомогенности адсорбента.

вполне вероятно появление целого набора всевозможных «констант диссоциации», распределение которых не обязательно будет равномерным. Есть ли возможность усреднить эти величины и использовать одну цифру, которая будет характеризовать взаимодействие большинства молекул? Если нет, то математические сложности и необходимость знать функцию распределения констант сделает это приближение практически невозможным. К счастью, в большинстве случаев можно использовать одну «кажущуюся» константу диссоциации. Отклонение от идеального поведения из-за такого приближения можно объяснить если не математически, то описательно.

Эксперименты, проведенные с ионообменниками, указывают на то, что связывание в основном может быть описано одной константой диссоциации, что делает этот подход полезным и даже почти количественным [29, 38]. Если мы обозначим концентрацию белка в свободном растворе, находящемся в равновесии с адсорбентом, через p, концентрацию свободных эффективных центров связывания через m (эффективными центрами связывания считаются такие, которые белок может занять без стерических препятствий со стороны соседних связанных белков и сродство которых к белку достаточно высоко, чтобы эффект был наблюдаем), концентрацию белка, связанного с носителем, через q, тогда константу диссоциации для взаимодействия белка с носителем K_P можно определить следующим образом:

$$K_P = \frac{m \cdot p}{q}. \tag{4.1}$$

Для того чтобы правильно определить члены этого уравнения, нужно уточнить объем, занимаемый данным количеством носителя; определение будет разумным, если допустить, что адсорбент имеет объем, равный объему, который он занимает в колонке. В этих условиях типичный современный адсорбент на основе целлюлозы или агарозы имел бы эффективный жидкостный объем (V_e)[1], составляющий 75—90% общего объема (V_t), а адсорбент плюс связанная вода занимали бы остальное пространство. Таким образом, *количество* белка в свободном растворе, окружающем адсорбент, несколько меньше, чем его концентрация, умноженная на *общий* объем.

Определив эту константу диссоциации, мы теперь можем использовать ее наиболее удобным для адсорбционной хроматографии способом. Адсорбция представляет собой распределение растворенного вещества (белка) между двумя фазами — жидкой и твердой. Коэффициент распределения можно определить

---

[1] V_e — «свободный объем», как он определяется в теории гель-фильтрации, т. е. объем, доступный макромолекулам и зависящий от размера белка.

как количество адсорбированного в данный момент растворенного вещества, отнесенное к полному его количеству. Он может быть также определен как доля растворенного вещества в растворе, и в этом смысле коэффициент распределения идентичен R_f — подвижности растворенного вещества относительно фронта буфера. Здесь будет использовано первое определение. Коэффициент распределения обозначается α ($\alpha = 1 - r_f$), и в этой главе мы будем очень часто обращаться к данной величине. Следует отметить, что когда говорят о низких значениях α, то подразумевают значения от 0 до примерно 0,5; высокие же значения — это значения, близкие к единице.

Взаимосвязь между α и K_P может быть определена следующим образом.

Пусть общая эффективная концентрация центров адсорбции (т. е. их способность адсорбировать тот белок, о котором идет речь) будет m_t. Допустим, что общая концентрация белка (свободный+связанный) на адсорбенте равна p_t, тогда

$$m_t = m + q, \tag{4.2}$$

$$p_t = p + q, \tag{4.3}$$

$$\alpha = \frac{q}{p_t}. \tag{4.4}$$

Подставляя в уравнение (4.1) значения q, m и p, определенные из уравнений (4.2), (4.3) и (4.4), получаем

$$K_P = \frac{(m_t - p_t\alpha)(p_t - p_t\alpha)}{p_t\alpha} = \frac{(m_t - p_t\alpha)(1-\alpha)}{\alpha};$$

отсюда

$$p_t\alpha^2 - \alpha(m_t + p_t + K_P) + m_t = 0. \tag{4.5}$$

Таким образом, α — это корень квадратного уравнения, значения которого лежат в пределах от 0 до 1. Следует отметить, что в условиях, когда $m_t \gg p_t$, например когда число центров связывания намного больше, чем количество белка, которое нужно связать, имеем

$$m \simeq m_t, \qquad q = p_t\alpha \quad \text{и} \quad p = p_t - q = p_t(1-\alpha);$$

следовательно,

$$K_P = \frac{m \cdot p}{q} = \frac{m_t \cdot (1-\alpha)}{\alpha}. \tag{4.6}$$

Теперь величину α можно очень просто определить экспериментальным путем; в определенных условиях p_t и m_t легко измерить и таким образом экспериментально проверить обоснованность приведенных аргументов, а также определить величины K_P. Концентрация эффективных центров связывания обычно варьирует от 0,01 мМ для аффинных адсорбентов до 1 мМ[1] и более для ионообменников. В тех же пределах будут

[1] Эта величина сильно зависит от размеров молекулы белка; см. табл. 4.3.

Таблица 4.1. Решение уравнения $p_t\alpha^2 - \alpha(m_t + p_t + K_P) + m_t = 0$ относительно α

K_P, мМ	p_t, мМ	m_t, мМ	α	K_P, мМ	p_t, мМ	m_t, мМ	α
0,1	0,1	1,0	0,90	1,0	0,01	1,0	0,50
0,1	0,5	1,0	0,85	0,1	0,1	10	0,99
0,1	1,0	1,0	0,73	1,0	0,1	10	0,99
0,1	0,1	0,1	0,38	0,1	0,1	0,2	0,59
0,1	0,5	0,1	0,16	0,1	0,1	0,5	0,81
0,1	0,01	1,0	0,91	0,1	0,1	2	0,95
0,01	0,01	1,0	0,99	0,1	0,1	5	0,98
0,01	0,5	1,0	0,98				

лежать и величины общей концентрации белка. В табл. 4.1 представлены параметры уравнения (4.5) при различных величинах K_P. Для того чтобы на хроматографической колонке происходила приемлемая адсорбция, нужно, чтобы величина α была равна по крайней мере 0,8, откуда следует, что величина K_P, как правило, должна быть меньше 0,1 мМ. Что касается аффинных адсорбентов, то для них могут быть существенные отклонения.

Обычно при описании хроматографических процессов используют изотерму Ленгмюра, которая выражает количество связанного белка (q) через концентрацию свободного белка в растворе (p). Используя символы, приведенные выше, это выражение можно вывести из значения константы диссоциации K_P:

$$K_P = \frac{m \cdot p}{q} = \frac{(m_t - q)\,p}{q},$$

$$q\,(K_P + p) = m_t p, \qquad q = \frac{m_t p}{K_P + p} \quad \text{или} \quad \frac{k_1 p}{1 + k_2 p}. \tag{4.7}$$

Это и есть уравнение изотермы Ленгмюра. Следует отметить, что p — это концентрация *свободного* белка в состоянии равновесия, а не общая его концентрация. Изотерма Ленгмюра, таким образом, *не* связывает, как это иногда думают, количество адсорбированного белка с количеством *внесенного* белка. Величину p намного труднее измерить, чем величину p_t.

На рис. 4.2 изотерма Ленгмюра сравнивается с отношением количества адсорбированного к количеству внесенного белка и с величиной α.

Для методов колоночной хроматографии характерно использование относительно больших образцов, объем которых часто намного превышает объем колонки. Применяются буферные растворы, подобранные так, чтобы адсорбировался нужный белок. С самого начала судьба белка может быть различна; при этом возможны три варианта. Белок либо полностью адсорбируется и не перемещается по колонке ($\alpha = 1$), либо совсем не адсорбируется ($\alpha = 0$), либо адсорбируется частично ($0 < \alpha < 1$), перемещается по колонке и выходит из нее, когда с момента его

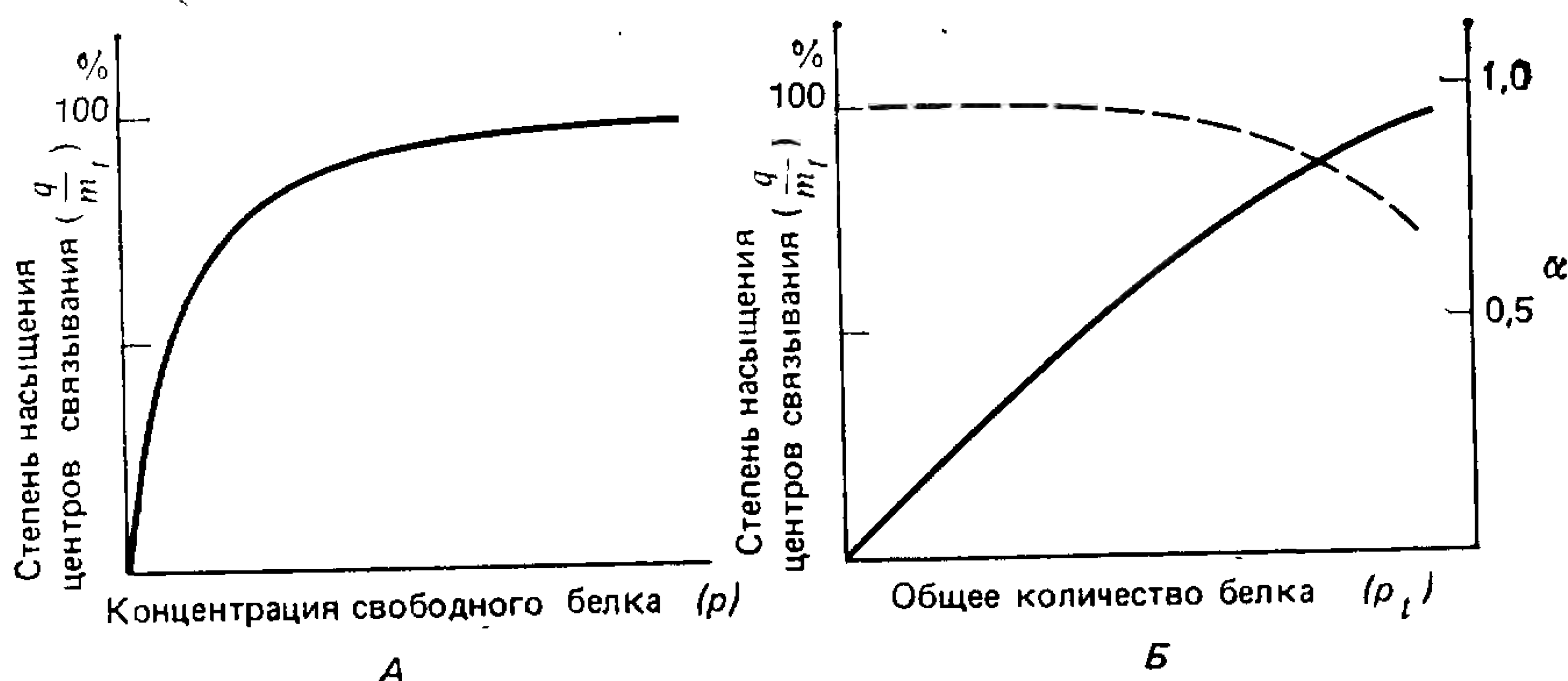


Рис. 4.2. *А*. Изотерма Ленгмюра, показывающая процентное содержание насыщенных центров (количество адсорбированного вещества) в зависимости от концентрации *свободного* вещества. *Б*. Степень насыщения (сплошная линия) и коэффициент распределения (прерывистая линия) в зависимости от *полного* количества добавленного вещества.

нанесения через колонку проходит объем жидкости, равный $1/(1-\alpha)$ объема колонки. Так, если объем нанесенного образца в 5 раз превышает объем колонки и колонку промывают еще 5 объемами буфера, то для того, чтобы данный белок остался на колонке, значение α должно быть больше 0,9. С другой стороны, если $\alpha=0{,}4$ и на колонку наносят небольшой объем образца, то можно реализовать очень удобный способ очистки (рис. 4.3). Как будет показано ниже, величина α очень быстро изменяется при малейших изменениях условий, поэтому мало вероятно, что какой-то другой белок будет иметь ту же промежуточную величину α. Если у интересующего нас белка вели-

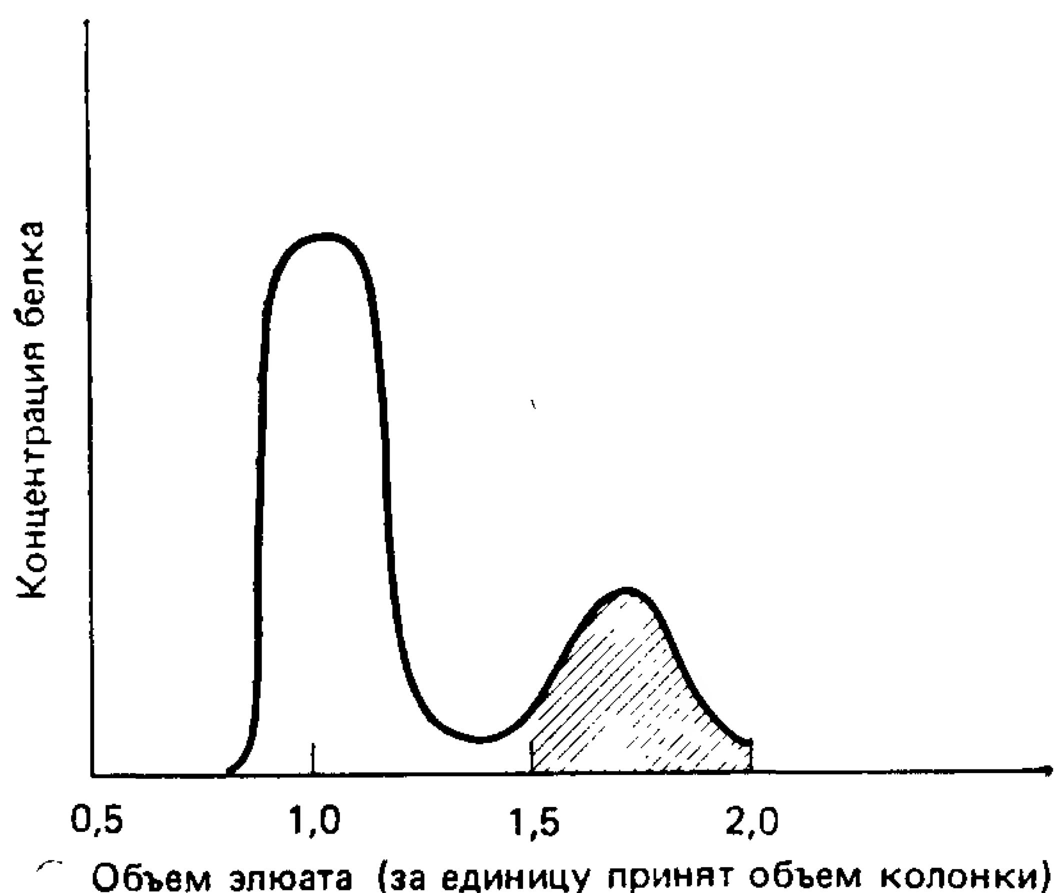


Рис. 4.3. Идеализированная кривая, отражающая поведение смеси белков с $\alpha=0$ и одного белка с $\alpha=0{,}4$. Белки с $\alpha=0$ выходят в объеме элюата, равном одному объему колонки. Белок с $\alpha=0{,}4$ выходит в объеме, равном $1/(1-\alpha)=1{,}7$ объемов колонки (заштрихованный пик). Для нанесения и элюции белков используют один и тот же буфер.

чина α равна нулю или немного больше нуля, то он проходит через колонку вместе со всеми другими белками, у которых величина α равна нулю. Это можно использовать в качестве одного из этапов очистки, особенно если основная масса белков остается сорбированной на колонке. В этом случае принципы хроматографии неприменимы и процесс основан на том, что белки с высокими, но не равными единице величинами α полностью адсорбируются на колонке. Такой процесс невозможен при адсорбции «из объема» (разд. 4.9). Если фермент находится во фракции, содержащей неадсорбированные белки, его можно получить очень быстро и со 100%-ным выходом, так как для этого не нужно использовать какую-то схему элюции. Фермент будет также, по всей вероятности, растворен в буфере с низкой ионной силой, в котором его можно сразу же нанести и адсорбировать на хроматографической колонке другого типа. Таким образом, хотя все возможности хроматографии полностью используются только после адсорбции на колонке всего фермента ($\alpha > 0,8$) и последующей элюции его путем смены буферных растворов по определенной схеме, по крайней мере его частичной очистки удается добиться и при других условиях.

Даже если все центры адсорбции эквивалентны, величина α зависит от концентрации белка [см. уравнение (4.5), рис. 4.2, *Б*], причем при более высокой его концентрации адсорбируется меньшая доля (хотя и большее количество) белка. Тот факт, что на самом деле существует целый ряд величин K_P, только усиливает этот эффект. В первую очередь белок занимает более сильные центры связывания (низкое значение K_P); при высокой концентрации белка требуется большее число более слабых центров связывания, что приводит к более высокому среднему значению K_P и более низкому α. В литературе при-

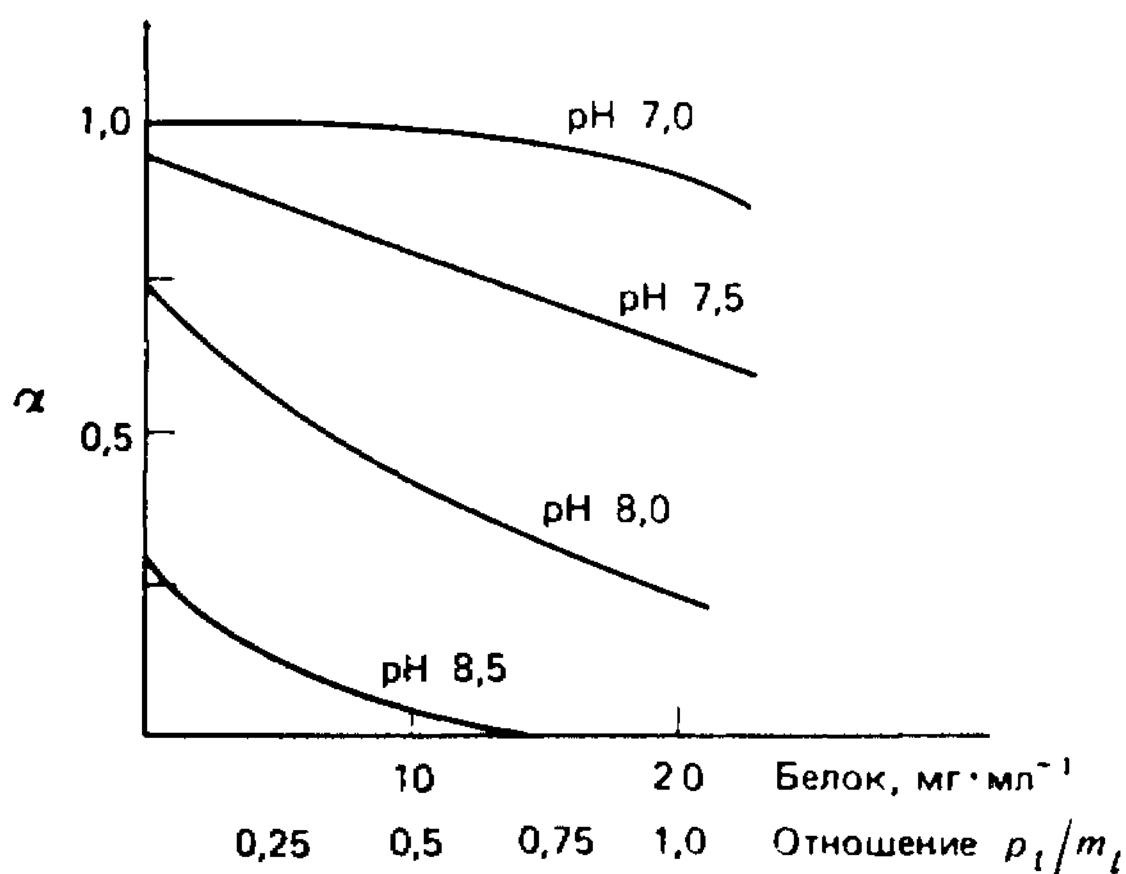


Рис. 4.4. Зависимость величины α от концентрации белка для альдолазы из мышц кролика, адсорбированной на КМ-целлюлозе при различных значениях pH. (Экспериментальные данные из работы Скоупса [38].)

водятся некоторые количественные параметры адсорбции альдолазы из мышц кролика на КМ-целлюлозе [38]. На рис. 4.4 эти результаты представлены в виде кривых изменения величины α в зависимости от общего количества белка при четырех различных значениях pH. При pH 7,5 концентрация общего белка в середине зоны альдолазы на колонке будет приближаться к m_t, а величина α будет приблизительно равна 0,6—0,7. Любой белок, двигающийся впереди основной зоны, благодаря диффузии или неравномерности потока через колонку разбавляется, и величина α повышается. В этом случае если $p_t/m_t=0{,}1$, то $\alpha=0{,}9$. Следовательно, этот белок большей частью адсорбируется и задерживается по отношению к основной зоне. В результате наблюдается эффект сужения (концентрирования) на передней границе белковой зоны. Однако понижение концентрации белка на задней границе приводит к постоянному увеличению силы связывания. Теперь α приближается к 0,9, так что задняя граница белковой зоны двигается со скоростью, составляющей только 10% скорости потока буфера, тогда как скорость движения основной зоны соответствует 30—40% скорости потока. В итоге при постоянном составе буфера фермент элюируется с колонки в виде пика с резкой передней границей, содержащей высокую концентрацию белка, но с очень длинным «хвостом» (рис. 4.5). Такая картина часто наблюдается при использовании ионообменников; однако эту трудность можно преодолеть, используя буферные градиенты (разд. 4.3).

Из графика, приведенного на рис. 4.4, можно подсчитать, что измеренные средние величины K_P изменяются приблизительно в 5 раз по мере того, как степень насыщения центров связывания изменяется от очень низких значений до 50%. Величи-



Рис. 4.5. Ожидаемый профиль элюции альдолазы кролика в условиях постоянного состава буфера при pH 7,5 (использованы данные, представленные на рис. 4.4). Появление длинного «хвоста» объясняется повышением величины α в процессе разбавления белка.

на m_t для всех доступных центров связывания не может быть одной и той же в разных условиях. Общая эффективная емкость ионообменника значительно увеличивается при очень прочном связывании и уменьшается при слабом, хотя структура и распределение центров связывания зависят только от адсорбента. Если белок имеет суммарный заряд, равный 50, то он может связаться со «слабым» центром; если же этот заряд равен 30, то никакого заметного взаимодействия может и не наблюдаться.

Другое существенное осложнение состоит в том, что некоторая часть адсорбционных центров медленно связывается с белком. Иногда эта зависимость от времени такова, что для полного насыщения может потребоваться не менее часа. Ясно, что в этих случаях подход, основанный на равновесии, неприменим. Такие труднодоступные центры связываются с белком в процессе длительного нанесения его на колонку. Если нанесение белка на колонку занимает много времени, то обычно много времени требуется и для выхода белка из колонки. Таким образом, при быстрой элюции какое-то количество фермента остается на колонке и элюируется позже, что вызывает размывание задней границы белковой зоны (образование «хвоста»). Это явление уже обсуждалось выше в рамках представлений о равновесии при анализе коэффициентов распределения и изменения констант диссоциации. Некоторые белки могут остаться на колонке, особенно если при изменении состава буфера происходит сжатие адсорбента, что в конце концов приводит к захватыванию белка в труднодоступном центре связывания.

Последнее осложнение, нарушающее теоретические предсказания, связано с негомогенностью адсорбента; несомненно, это основной фактор, от которого зависят величины K_P, но это означает также, что концентрация центров связывания m_t [уравнение (4.2)] является усредненной величиной, так как ее подсчитывают исходя из концентрации связанного белка. В некоторых адсорбентах большой объем носителя очень слабо модифицирован, так что число эффективных центров связывания здесь незначительно, но там, где произошла модификация адсорбента, это число настолько велико, что практически весь связанный белок остается в этой относительно небольшой части общего объема адсорбента. Следовательно, истинная эффективная величина m_t в уравнении (4.5) может быть намного выше, чем среднее ее значение, подсчитанное исходя из связывания белка на 1 $см^3$ адсорбента. Это приведет к повышению величины α по сравнению с тем, что наблюдается, когда центры связывания распределены в матрице равномерно. Далее этот вопрос будет обсуждаться при описании аффинной адсорбции (разд. 4.5).

Резюмируя вышеизложенное, можно сказать, что использование константы диссоциации при описании адсорбционных эффектов в процессе сорбции белков носителем может быть полезным, если иметь в виду, что в большинстве случаев не существует какой-то одной величины константы диссоциации, а усредненная величина меняется в зависимости от степени насыщения центров связывания. Аналогично коэффициент распределения, являющийся важным экспериментальным параметром, может снижаться как непосредственно по мере приближения к состоянию насыщения, так и опосредованно, в результате того, что увеличение числа занятых центров приводит в среднем к снижению сродства, т. е. к снижению величины α.

4.2. ИОНООБМЕННИКИ: ПРИНЦИПЫ, СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ

Хотя предыдущий раздел посвящен общим принципам хроматографии, в нем часто упоминаются ионообменники, и многие теоретические положения были проверены именно на ионообменных адсорбентах. Белки связываются ионообменником в основном с помощью электростатических сил между заряженными поверхностями белков и плотными кластерами заряженных групп на ионообменнике. Степень модификации типичной диэтиламиноэтил(ДЭАЭ)целлюлозы или карбоксиметил(КМ)целлюлозы может быть достаточно высока — до 0,5 ммоль·см$^{-3}$ (для набухшего адсорбента в колонке), что соответствует 0,5 *М* концентрации заряженных групп. Заряды, конечно, нейтрализованы противоионами (ионами противоположного знака), такими, как ионы металлов, хлорид-ионы и иногда ионы буфера. Белок должен вытеснить противоионы и связаться с матрицей. Обычно суммарный заряд на белке имеет тот же знак, что и вытесняемые противоионы, отсюда происходит термин «ионный обмен». Молекулы белка в растворе также нейтрализуются ионами противоположного знака; суммарный эффект сводится к тому, что данная область адсорбента становится электрически нейтральной. Это явление иллюстрирует рис. 4.6. Здесь представлена ситуация, когда отрицательно заряженный белок предварительно уравновешен буфером трис-Cl; таким образом, с белком соединяют ионы Н-трис$^+$. Адсорбент же (ДЭАЭ-целлюлоза), также уравновешенный буфером, несет на себе противоионы Cl^-.

Белок затем замещает хлорид-ионы и занимает центры связывания на адсорбенте, при этом образуется трис-Cl. Следует отметить, что трис-Cl представляет собой кислую соль триса, и, если замещение идет быстро, в колонке может произойти сни-

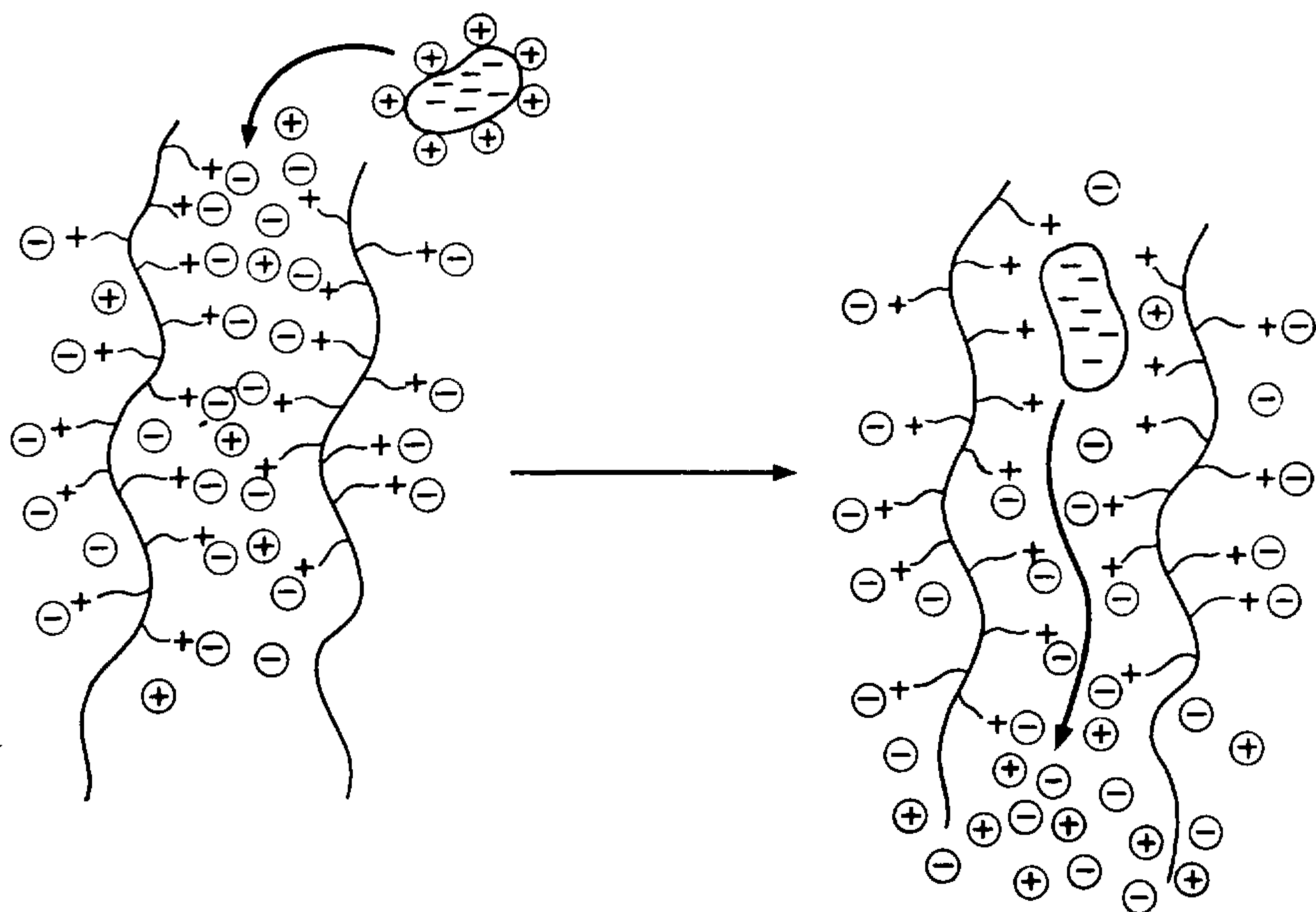


Рис. 4.6. Схема «ионного обмена», происходящего при адсорбции отрицательно заряженного белка на ионообменнике. Семь положительно заряженных ионов (например, Н-трис$^+$), ассоциированных с молекулой белка, вытесняются из ионообменника вместе с семью отрицательными ионами (Cl^-).

жение эффективного значения pH впереди зоны адсорбированного белка.

К тому же образование трис-Cl приводит к повышению ионной силы буфера, проходящего через колонку. Обычно на каждый 1 мг·мл$^{-1}$ адсорбированного белка дополнительно образуются соли буфера в концентрации 1 мМ. При высокой концентрации нанесенного образца pH неадсорбированных фракций будет ниже, чем pH предшествовавшего промывочного буфера (или выше, если речь идет о катионообменнике). Для того чтобы избежать этих изменений величины pH и ионной силы, в результате которых адсорбция может быть ниже ожидаемой величины, концентрация наносимого на колонку белка не должна быть слишком высокой — особенно если предполагается, что значительная его часть адсорбируется на колонке. Это означает также, что необходимо использовать растворы, обладающие достаточной буферной емкостью, — в отсутствие буфера могут произойти значительные изменения pH, приводящие к денатурации белка. Обычно используют буфер, минимальная концентрация которого составляет 10 мМ при значении pH, отличающемся не более чем на 0,3 единицы от величины его pK_a (см.

табл. 4.6 и разд. 6.1). Концентрация *адсорбируемого* белка не должна превышать 5 мг·мл$^{-1}$ (неадсорбируемые белки оказывают меньшее влияние; ср. разд. 4.3).

Предполагается, что существуют две формы взаимодействия белков с ионообменниками в процессе адсорбции. Одна из них называется «необратимым», а другая «обратимым» связыванием. Как отметил Петерсон [39], термин *необратимое связывание* неудачен, так как он подразумевает, что адсорбированный белок уже не выходит из колонки: связывание такого типа нельзя было бы использовать. Переходы от так называемой необратимой адсорбции к обратимой вследствие непрерывного изменения состава буфера должен быть постепенным. Вероятность того, что диссоциация молекулы белка происходит за 1 с при «обратимой» адсорбции, может составлять 99%, а при «необратимой» — 0,001% (эта величина никогда не бывает равной нулю); однако положение границы между этими двумя типами адсорбции — поистине весьма спорный вопрос. Указанную вероятность можно рассчитать из кривых зависимости адсорбции от pH, показанных на рис. 4.4, но часто используют другой способ выражения распределения адсорбированного на ионообменнике и неадсорбированного белка. Серия недавно проведенных экспериментов, аналогичных тем, результаты которых изображены на рис. 4.4, показала возможность перехода адсорбированной формы белка (коэффициент распределения близок к 1) в неадсорбированную (коэффициент распределения равен 0)

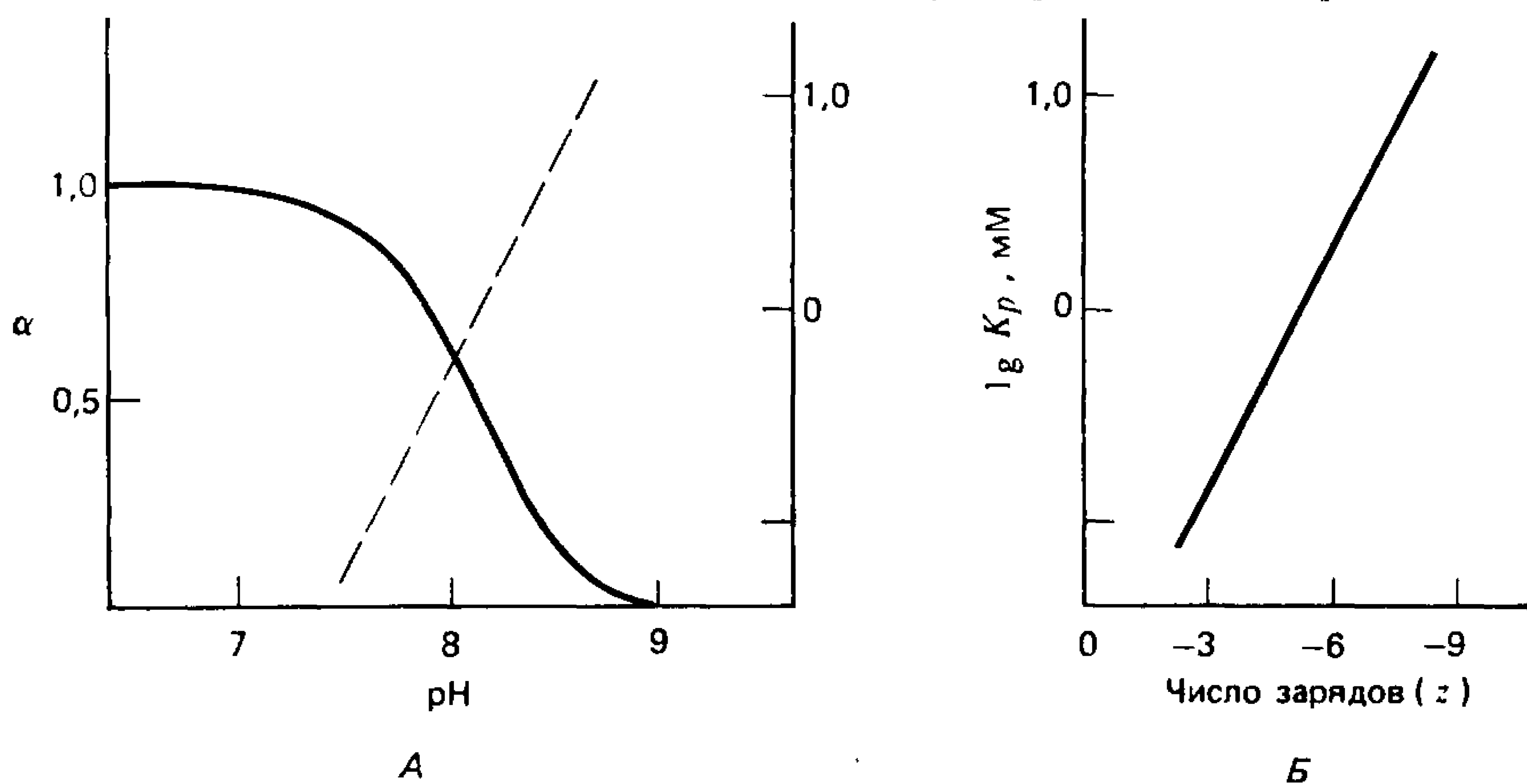


Рис. 4.7. *А*. Изменение значения α в зависимости от pH для сорбированной на КМ-целлюлозе фосфоглицераткиназы из дрожжей. I=0,01 (непрерывная линия). Значения K_P (прерывистая линия) были рассчитаны из уравнения (4.6). *Б*. Зависимость log K_P от числа зарядов на молекуле фермента, рассчитанная из кривой титрования и изоэлектрической точки, равной 7,1. Значение *s* (см. текст) равно 0,4.

при изменении pH буфера [38]. Расчеты, сделанные на основе этих кривых и уравнений, приведенных в разд. 4.1, позволяют количественно оценить величины констант диссоциации (допуская, что условия приближаются к равновесным) между белком и адсорбентом. В этих работах в качестве адсорбента была использована КМ-целлюлоза. Оказалось возможным не только рассчитать величины α и K_P, но исходя из скорости изменения этих величин в зависимости от pH получить величину энергии взаимодействия в расчете на единичный заряд белка. (Практически это скорость повышения энергии взаимодействия в расчете на каждый дополнительный положительный заряд, так как асимметрия в распределении зарядов и отсутствие данных о точных значениях изоэлектрических точек создает трудности при установлении точного числа зарядов белковой молекулы, участвующих во взаимодействии с адсорбентом.) Вывод уравнений, связывающих эти параметры, представлен ниже, а также на рис. 4.7.

Исходя из кривой pH-титрования и зная изоэлектрическую точку, можно подсчитать число зарядов на молекуле при каждом значении pH. Построение графика зависимости $\log K_P$ от числа зарядов на белковой молекуле (z) дает прямую, наклон которой (см. рис. 4.7) равен

$$s = (d \log K_P)/dz.$$

Энергия взаимодействия в расчете на 1 моль составляет

$$\Delta G^0 = -2{,}3RT \log K_P.$$

Следовательно, скорость изменения энергии взаимодействия на 1 моль при заряде z равна

$$\frac{dG^0}{dz} = -2{,}3RT \frac{d \log K_P}{dz} = -2{,}3RTs.$$

Величины $\frac{dG^0}{dz}$ для различных белков даны в табл. 4.2. Видно, что эти величины различаются лишь незначительно, в основном они лежат в пределах 1—2 кДж·моль$^{-1}$. Однако наименьший из исследованных белков, миокиназа (мол. масса 21 500), имеет наибольшую величину; это указывает на то, что дополнительные положительные заряды, приобретаемые данным белком в процессе титрования в пределах pH 7,5—6,0, сильнее взаимодействуют с ионообменником, чем положительные заряды на более крупных молекулах. Это происходит либо вследствие того, что молекулы меньшего размера способны более плотно упаковываться на ионообменнике (подтверждено экспериментами по определению емкости, см. ниже), либо потому, что в более мелких молекулах каждый заряд расположен в среднем значительно ближе к поверхности белковой молекулы, и поэтому электростатическое притяжение ионизированными карбоксиметильными группами адсорбента оказывается намного сильнее. Для того чтобы оценить число ионизированных групп, взаимодействующих с каждым зарядом белка, можно использовать соответствующие расстояния между усредненным аминокислотным остатком белковой молекулы и ионизированными карбоксиметильными группами, а также ди-

Таблица 4.2. Изменение энергии взаимодействия ферментов с КМ-целлюлозой в расчете на один положительный заряд фермента

Фермент	dG^0/dz, кДж·моль$^{-1}$
Фосфоглицераткиназа из дрожжей	2,0
АМР-киназа из мышц кролика	4,2
Креатинкиназа из мышц кролика	1,5
Альдолаза из мышц кролика	0,9
Пируваткиназа из мышц кролика	1,0
Пируваткиназа из дрожжей	1,7
Лактатдегидрогеназа из мышц кролика	0,7
Митохондриальная аспартатаминотрансфераза из сердца быка	0,9

электрическую постоянную D для воды и величину, равную 2 кДж·моль$^{-1}$ в расчете на каждый заряд, в уравнении (4.8):

$$E = \frac{-z_1 \cdot z_2}{D \cdot r}, \qquad (4.8)$$

где $z_1 z_2$ — заряды на притягивающихся компонентах ($-z_1$ для белка и z_2 для адсорбента), r — расстояние между ними; если принять, что оно равно 5 нм, то

$$E \text{ (в расчете на заряд } z_1) = -z_2/D \cdot r = 2 \text{ кДж·моль}^{-1}.$$

Отсюда z_2 равно приблизительно −5, т. е. в среднем 5 карбоксиметильных групп оказывают влияние на каждый положительный заряд белка. В основе этих вычислений лежат весьма широкие допущения, но по крайней мере величина, полученная для z_2, вполне приемлема, если принять во внимание вероятную пространственную плотность заряженных кластеров карбоксиметильных групп по отношению к размерам белковых молекул.

Адсорбционная емкость ионообменников

Количество белка, которое может связать ионообменник в расчете на единицу объема, может быть очень большим. Однако у обменников классического типа, таких, как материалы на основе целлюлозы, это количество зависит в основном от размеров белковых молекул — чем мельче молекулы белка, тем в большей степени он адсорбируется. При выражении количества белка в молях это различие еще увеличивается. Некоторые типичные величины даны в табл. 4.3. Молекулы белков с мол. массой более 10^6 не задерживаются (исключаются) большинством целлюлозных ионообменников. Здесь проявляется практически тот же ситовой эффект, что и при гель-фильтрации (разд. 5.1). Крупные молекулы могут присоединяться только к поверхности частиц ионообменника, и поэтому емкость ионообменника для них очень низка. Общая емкость связана с вели-

Таблица 4.3. Емкость КМ-целлюлозы (Whatman CM 52) для различных белков при $\alpha=1,0$ (pH 6,0, I=0,01)[1]

Белок	Мол. масса	Емкость, мг·см$^{-3}$	Емкость m_t, мМ
Лизоцим из белка куриного яйца	14 300	130	9,0
АМР-киназа	21 400	100	4,6
Фосфоглицераткиназа из дрожжей и мышц кролика	45 000	70	1,55
Фосфоглицератмутаза	60 000	40	0,67
Креатинкиназа	82 000	35	0,43
Енолаза	88 000	48	0,55
Лактатдегидрогеназа	140 000	21	0,15
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа	145 000	26	0,18
Альдолаза	160 000	22	0,14
Пируваткиназа	228 000	12,5	0,055

[1]) См. рис. 4.8, где эти данные представлены в виде графика.

Примечание: если источник не указан, то это значит, что фермент выделен из мышц кролика.

Данные взяты из работы Скоупса [38].

чиной внутреннего объема частицы, доступного для белков, и так же, как и при гель-фильтрации, зависит лишь от размера пор. Как показано на рис. 4.8, емкость, выраженная в мг·см$^{-3}$, повышается по мере снижения молекулярной массы белков так, что зависимость емкости от log мол. массы представляет собой почти прямую линию. Интересно отметить, что адсорбент, уже «насыщенный» крупными молекулами белка, все еще способен связывать молекулы небольшого размера при условии, что поры стерически не блокированы крупными молекулами. Для подтверждения этого был проведен эксперимент на КМ-целлюлозе при pH 6,0 в условиях, описанных на рис. 4.8. Было показано, что при обработке 1 см$^{-3}$ КМ-целлюлозы избытком пируваткиназы мышц кролика (мол. масса 228 000) адсорбировалось 13 мг фермента. КМ-целлюлозу промывали буфером, а затем добавляли 50 мг лизоцима (мол. масса 14 500). Весь лизоцим полностью адсорбировался на КМ-целлюлозе; при этом вытеснения пируваткиназы не наблюдалось. Отсюда следует, что перегрузка колонки может привести к тому, что сначала из колонки будут выходить более крупные молекулы, так как емкость адсорбента может быть достаточной для адсорбции всех более мелких молекул — это будет зависеть от соотношения больших и малых молекул в наносимом образце. Новейшие ионообменники имеют более высокий верхний предел исключения. Так, трисакрил фирмы LKB способен адсорбировать вещества с мол. массой до 10^7 [40].

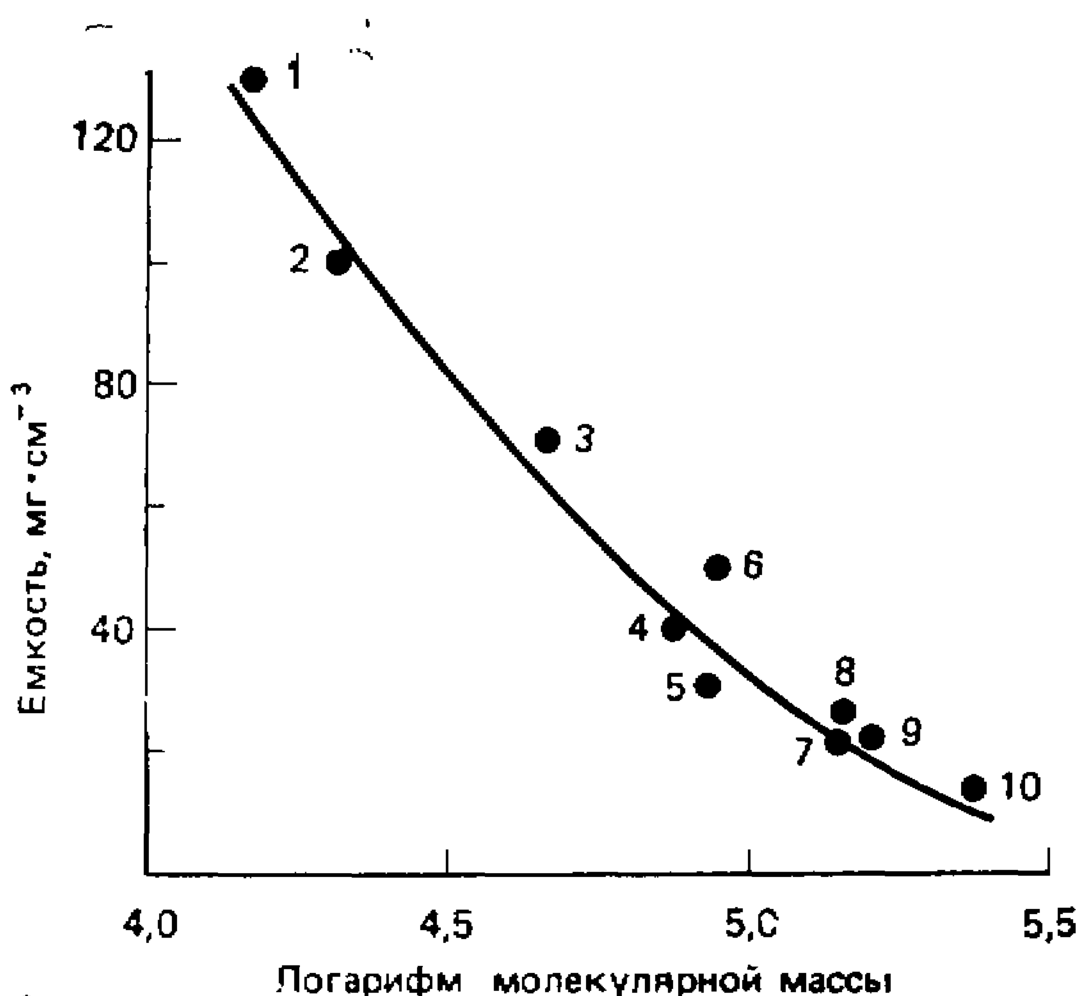


Рис. 4.8. Емкость КМ-целлюлозы для различных белков (в условиях, когда $\alpha = 1{,}0$). Использованы следующие белки: *1* — лизоцим из белка куриных яиц; *2*— АМР-киназа; *3* — фосфоглицераткиназа (емкость одинакова как для препарата из дрожжей, так и для препарата из мышц кролика); *4* — фосфоглицератмутаза; *5* — креатинкиназа (при 0 °C); *6* — енолаза; *7* — лактатдегидрогеназа; *8* — глицеральдегидфосфатдегидрогеназа; *9* — альдолаза; *10* — пируваткиназа [38].

Типы ионообменников

За долгие годы разработано множество различных типов ионообменников, но значительная их часть не нашла широкого применения или была вытеснена более совершенными материалами. Начинающий исследователь может ограничиться в своей работе только двумя типами смол — катионообменником (карбоксиметилпроизводным) и анионообменником (диэтиламиноэтилпроизводным). Хотя фосфоцеллюлоза применяется для многих целей, есть много данных, свидетельствующих, что она сочетает свойства и ионообменника, и аффинного адсорбента, обладающего специфическим сродством к ферментам, субстратами которых служат фосфорные эфиры; поэтому фосфоцеллюлоза относится к особой категории адсорбентов. Чтобы получить подходящие материалы для ионообменной хроматографии белков, к целлюлозе, агарозе и декстрану были присоединены карбоксильные и диэтиламиноэтильные группы. Ранее в качестве адсорбентов использовали крупные частицы целлюлозы, обладающие рядом полезных свойств, таких, как быстрая флоккуляция и хорошая скорость потока в колонке. Однако эти адсорбенты имели относительно небольшое число центров связывания для белков, особенно для крупных белковых молекул, что обусловлено микроструктурой их частиц, так что емкость этого материала была ограниченной. Усовершенствованная, микрокристаллическая, целлюлоза была разработана фирмой Whatman, и два ионообменника на ее основе, КМ-32 и ДЭ-32 (в виде сухих порошков), а также КМ-52 и ДЭ-52 (влажные, спрессованные волокна) нашли широкое применение. Эти материалы и до

сих пор могут конкурировать, по крайней мере в цене, с более новыми и более сложными материалами.

При присоединении этих заместителей к сферическим частицам декстрана (сефадекс фирмы Pharmacia) были получены адсорбенты с высокой емкостью и надежно воспроизводимыми свойствами. Однако они оказались не очень удачными из-за их усадки при замене буфера. В воде мягкие гранулы декстрана сильно разбухают вследствие того, что между одноименными зарядами внутри модифицированных гранул возникают силы отталкивания; при этом получается почти прозрачная суспензия. Силы отталкивания ослабевают по мере повышения концентрации соли, и гранулы сжимаются. Это явление нежелательно, если оно происходит в колонке. Усадка материала в колонке, обусловленная сжатием гранул, не только порождает технические затруднения, связанные с увеличением мертвого пространства и нестабильным градиентом, но и может привести к тому, что белки, особенно крупные, захватываются гранулами и не элюируются с колонки. Таким образом, декстрановые ионообменники следует использовать лишь в тех случаях, когда образец можно нанести на колонку при относительно высокой ионной силе (>0,1) или же когда ионная сила остается постоянной, а белки вымываются из колонки путем изменения pH и (или) с помощью аффинной элюции (разд. 4.4). Более удачными материалами, выпускаемыми фирмой Pharmacia (и другими поставщиками), являются модифицированные поперечно-сшитые гели агарозы такие, как ДЭАЭ-сефароза. Гранулы геля агарозы имеют высокий предел исключения, поэтому их можно использовать при работе с белками, размер молекул которых достигает 10^6 дальтон. Из-за наличия поперечных сшивок гель агарозы обладает значительной жесткостью и объем его мало меняется при изменении условий. Фирма Pharmacia производит также сферические гранулы целлюлозы: в настоящее время используется только ДЭАЭ-сефацел. Некоторые, наиболее известные ионообменники приведены в табл. 4.4.

О других модификациях носителей до сих пор не упоминалось в основном потому, что в большинстве случаев все необходимые процедуры могут быть проведены с помощью одного катионообменника и одного анионообменника. При слишком большом выборе материалов много времени затрачивается на то, чтобы опробовать каждый из них. Теперь мы все же дадим описание некоторых других материалов и их свойств. При крайних значениях pH как КМ-, так и ДЭАЭ-заместители становятся незаряженными. Если необходимо использовать анионообменник при pH выше 9 или катионообменник при pH ниже 4 (лишь немногие ферменты стабильны в этих условиях), нужны другие модификации. К гранулам целлюлозы или декстрана были при-

Таблица 4.4. Некоторые имеющиеся в продаже ионообменники

	Анионообменники	Катионообменники
На основе целлюлозы	ДЭАЭ[2, 3] ТЭАЭ[2] ЧАЭ (QAE)[2]	КМ[2, 3] Фосфо[2, 3]
Сефацелы (сферические гранулы целлюлозы)	ДЭАЭ[1]	
Сефадексы (сферические гранулы декстрана)	ДЭАЭ[1] ЧАЭ (QAE)[1]	КМ[1] Сульфопропил (СП)[1]
На основе агарозы	ДЭАЭ[1, 2] ПЭИ (полибуферные ионообменники)[1]	КМ[1, 2]
На основе синтетического полимера (трисакрил)	ДЭАЭ[4]	КМ[4]

[1]) Pharmacia.
[2]) Bio-Rad.
[3]) Whatman.
[4]) LKB.

Сокращения: ДЭАЭ — диэтиламиноэтил; ТЭАЭ — триэтиламиноэтил; ЧАЭ (QAE) — диэтил-(2-гидроксипропил)-аминоэтил (четвертичный аминоэтил); ПЭИ — полиэтиленимино; КМ — карбоксиметил.

соединены сульфоэтиловые или сульфопропиловые группы, остающиеся ионизированными при pH ниже 2. В анионообменниках четвертичные аммониевые группы ионизированы даже при pH 12. На рис. 4.9 приведены кривые титрования замещенных сефадексов в 1 М KCl. Хотя ЧАЭ(QAE)-сефадекс имеет на кривой титрования небольшой изгиб при pH 7, он полностью положительно заряжен при всех значениях pH ниже 12. Аналогично СП-сефадекс полностью отрицательно заряжен при значениях pH выше 2. КМ-сефадекс (и другие карбоксиметилсодержащие материалы) титруются при pH около 4,5, и их можно считать полностью отрицательно заряженными при pH выше 5,5. ДЭАЭ-замещенные материалы (это относится как к целлюлозам и агарозе, так и к декстранам) обладают более сложными свойствами, и их можно считать полностью положительно заряженными только при pH ниже 5. Хотя диэтиламиноэтильная группа имеет pK_a в области 9—9,5, отмечено, что ДЭАЭ-замещенные материалы титруются при pH 6—8 (рис. 4.10). Это происходит из-за того, что в результате электростатического отталкивания протонов близко расположенные заместители влияют на величины pK_a друг друга. Таким образом, ДЭАЭ-целлюлоза, наиболее часто используемый ионообменник, имеет сложную структуру и сложную кривую титрования, причем в обычно используемых буферных растворах при pH 6—9 некоторые груп-

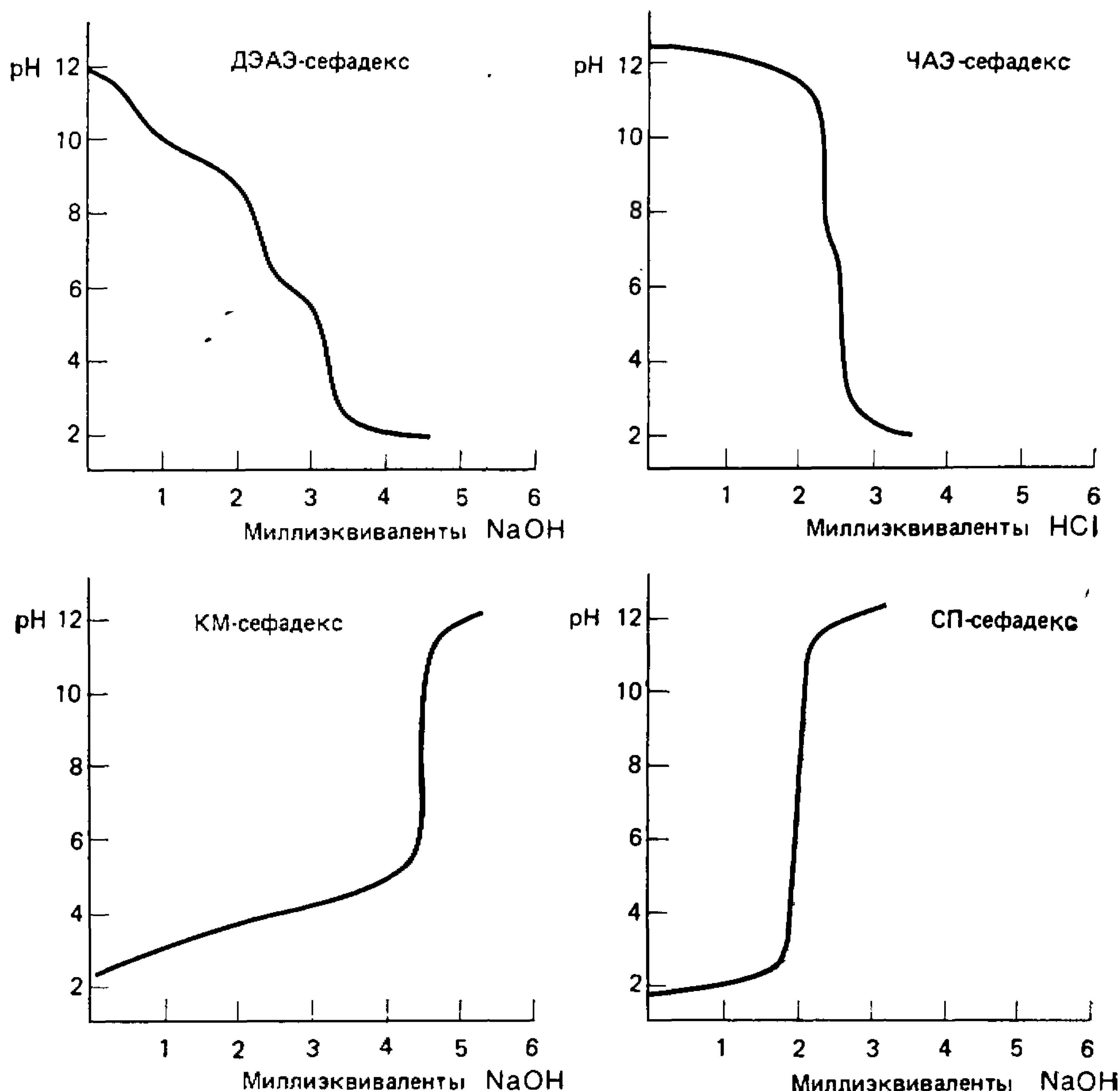


Рис. 4.9. Кривые титрования ионообменных сефадексов в 1 М KCl. (С любезного разрешения фирмы Pharmacia Fine Chemicals [41].)

пы адсорбента ионизированы только частично. Это, однако, не умаляет ее достоинств. Бóльшая часть схем элюции была разработана эмпирически, и поэтому указанные свойства адсорбента не имеют большого значения. Однако стоит отметить, что при более низких значениях pH, при которых лишь немногие белки несут отрицательный заряд, достаточный для адсорбции на различных ДЭАЭ-производных, *емкость* адсорбента для белков, все же способных связываться с ним, возрастает. Следовательно, вероятность того, что адсорбент будет перегружен, уменьшается при использовании буфера с более низким значением pH.

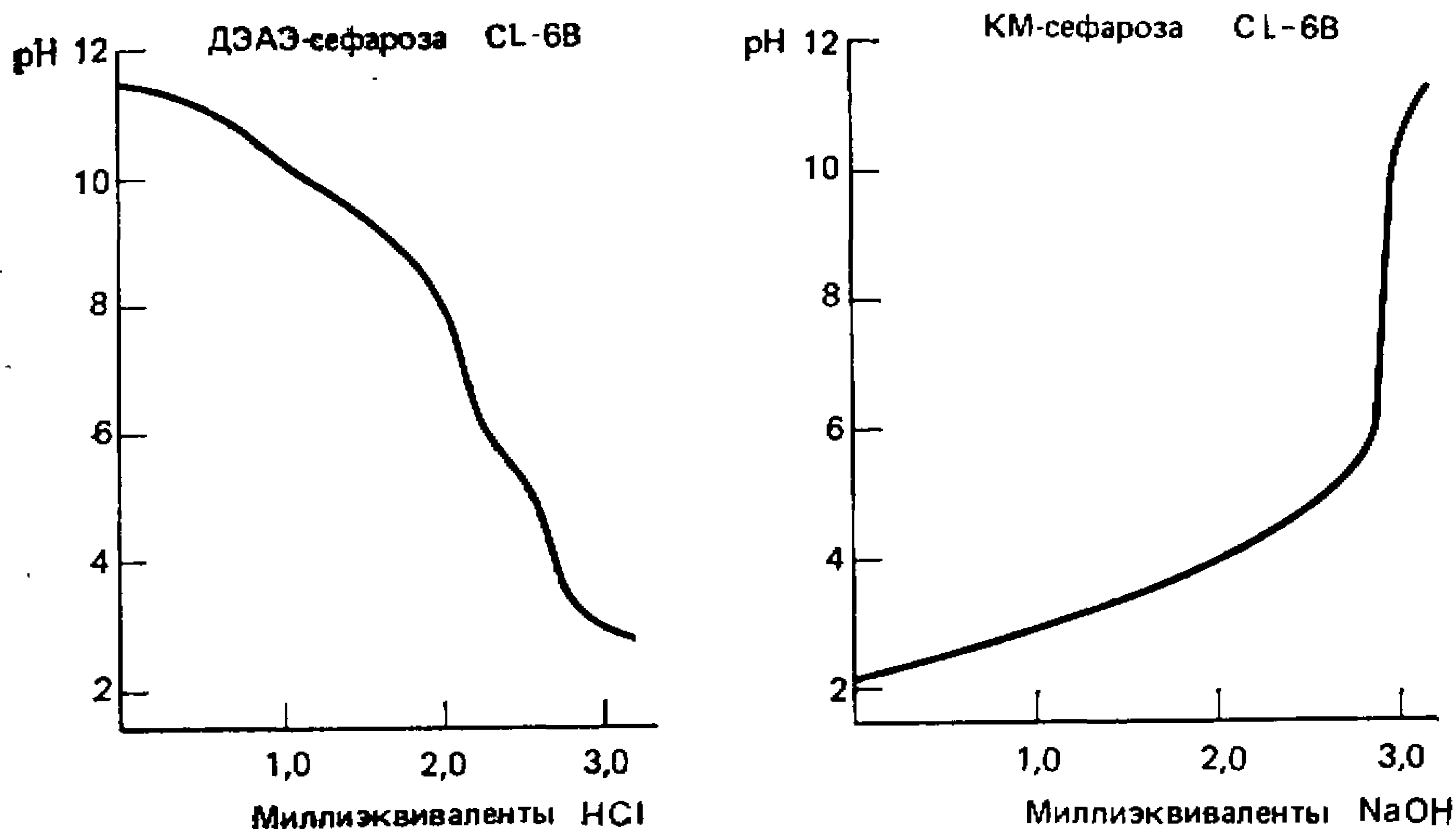


Рис. 4.10. Кривые титрования ДЭАЭ-сефарозы и КМ-сефарозы в 1 *M* KCl. (С любезного разрешения фирмы Pharmacia Fine Chemicals [41].)

При работе с ЧАЭ- и СП-сефадексами возникают проблемы набухания и усадки, о которых мы уже говорили выше. Целлюлоза, замещенная триэтиламиноэтильной, т. е. четвертичной, аммониевой группой (ТЭАЭ-целлюлоза), в течение некоторого времени была довольно распространенным ионообменником. Кривая ее титрования, однако, не сильно отличается от соответствующей кривой для ДЭАЭ-целлюлозы. Из этого следует, что на самом деле лишь незначительное число групп в ней представляет собой четвертичные аммониевые группы. Другие заместители, такие, как ЭКТЭОЛА и аминоэтильная группа, сейчас почти не используются. В идеале было бы вполне достаточно иметь два ионообменника (ни один из которых не выпускается промышленностью): модифицированную четвертичными аммониевыми группами агарозу с поперечными сшивками (или сферические гранулы целлюлозы, либо материал на основе органических полимеров) в качестве анионообменника и агарозу, модифицированную сульфопропильными группами в качестве катионообменника. Но бывают случаи, когда специально выбирают адсорбент с *низкой* емкостью для белков — необходимый белок связывается очень прочно, остальные же совсем не связываются. При высокой степени модификации ионообменника прочность связывания может быть настолько велика, что белок совсем не выходит из колонки. В этих случаях можно использовать стандартные материалы с определенной, более низкой степенью модификации. Причиной того, что более низкая степень

модификации не только снижает емкость, но и уменьшает прочность связывания, служит ослабление электростатических взаимодействий между белком и адсорбентом с малым количеством заместителей на единицу объема.

Величина pH и эффект Доннана

Значение pH в микроокружении ионообменника отличается от его значения в наносимом на колонку или вытекающем из колонки буфере, так как протоны внутри матрицы адсорбента могут отталкиваться или притягиваться за счет эффекта Доннана. В общем pH матрицы бывает обычно на 1 единицу выше, чем pH окружающего буфера, в анионообменнике и на 1 единицу ниже — в катионообменнике (рис. 4.11). Чем ниже ионная сила буфера, тем значительнее эта разница. Такое явление имеет очень важные последствия, когда речь идет о стабильности фермента в зависимости от pH. Фермент, стабильный при pH 5,5, может быстро денатурировать в растворе при pH 4,5. Если такой фермент адсорбируется на катионообменнике при pH 5,5, то он оказывается в микроокружении с pH ниже 5,5 и вероятность его денатурации на адсорбенте повышается. Поскольку эффект Доннана приводит к сдвигу величины pH в сторону крайних значений, это заметно ограничивает интервал значений pH, при которых можно работать на ионообменниках, особенно слабокислую область в случае катионообменников. Как правило, ферменты имеют тенденцию сохранять бóльшую стабильность в слабощелочной среде, например при pH 8—10, чем

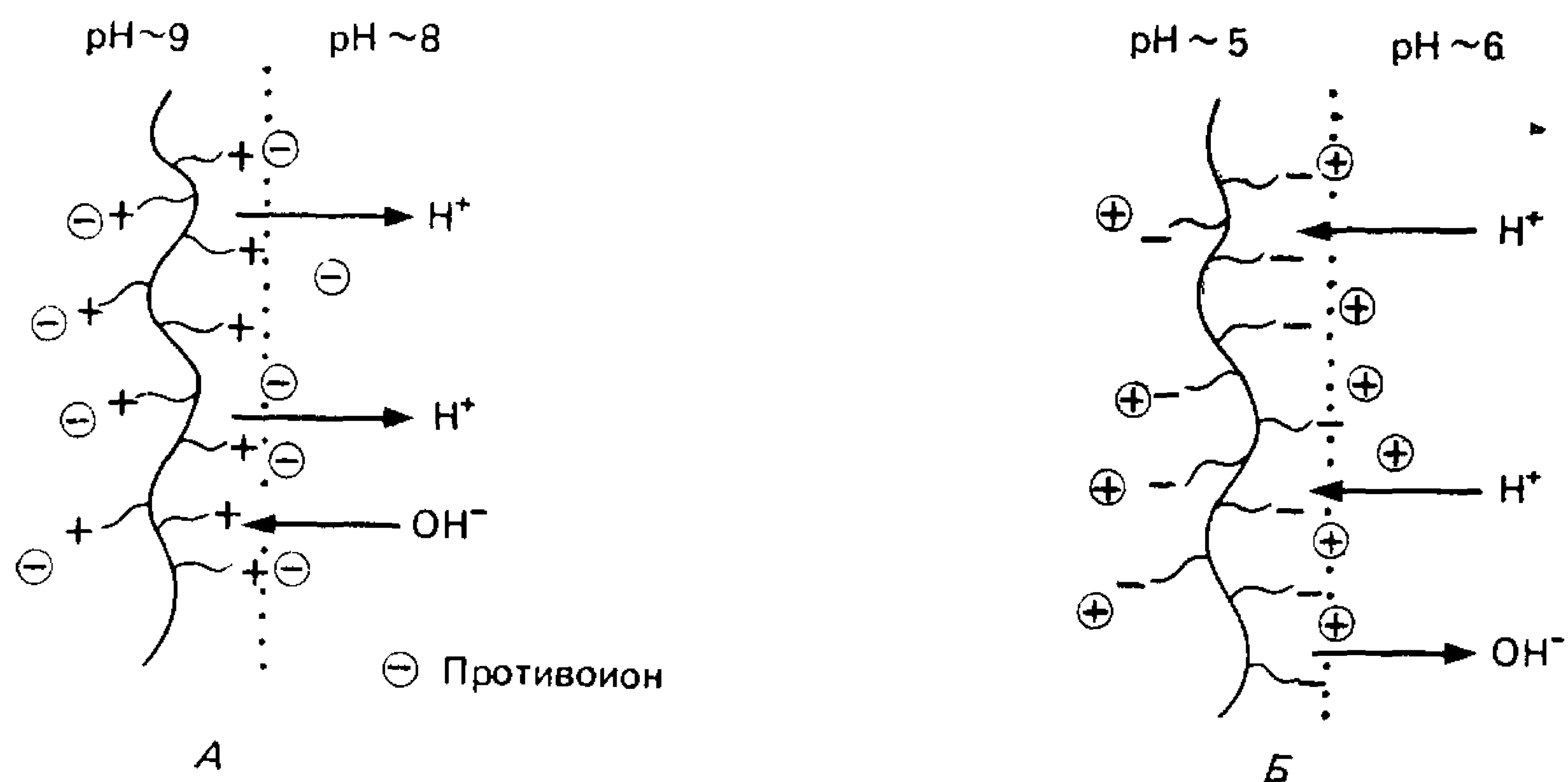


Рис. 4.11. Влияние эффекта Доннана на pH в микроокружении ионообменников. *А*. Протоны выталкиваются из непосредственного окружения анионообменника, а гидроксил-ионы притягиваются к нему. *Б*. Протоны притягиваются к непосредственному окружению катионообменника, а гидроксил-ионы выталкиваются.

в слабокислой (pH 6—4), так что при использовании анионообменников потери белка в результате денатурации оказываются меньше.

Элюция адсорбированного белка

Теоретически существуют два общих метода элюции белков (не считая аффинной элюции, разд. 4.4): а) изменение pH буфера до величины, при которой связывание белка с адсорбентом ослабевает; для анионообменников используют более низкие значения pH, а для катионообменников — более высокие; б) повышение ионной силы, что вызывает ослабление электростатического взаимодействия между белком и адсорбентом. На практике метод *а* не всегда дает хорошие результаты. Это объясняется тем, что при недостаточно высокой буферной емкости резкое и значительное изменение pH по мере элюции белков приводит к плохому разделению индивидуальных компонентов. При низкой ионной силе буферная емкость должна быть низкой, и попытка изменить значение pH, используя градиент pH, оказывается тщетной из-за буферной силы белков, адсорбированных на колонке, а в случае использования ДЭАЭ-адсорбентов — из-за буферных свойств самого адсорбента. Типичный результат показан на рис. 4.12. Градиент pH может быть успешно использован только тогда, когда интересующие нас белки первыми и очень прочно адсорбируются на ионообменнике. В этом случае можно использовать сильное забуферивание растворов при ионной силе 0,1 и больше. В одной из работ [29] была предложена схема получения сильных буферных градиентов pH при постоянной ионной силе.

Благодаря дальнейшему развитию методов элюции белков с ионообменников путем изменения значений pH этот подход стал значительно более успешным. Слюйтерман и др. [42—45] разработали способ, названный «хроматофокусированием», в котором градиент pH создается с помощью буферов амфолитного типа, обладающих высокой буферной емкостью, но низкой эффективной ионной силой. В качестве ионообменника предложен полиэтилениминагароза, которая, несмотря на ее сходство с ДЭАЭ-адсорбентами, непрерывно титруется в широкой области значений pH. Фирма Pharmacia выпускает эту систему, состоящую из буферных растворов и ионообменника, под названием «полибуфер» и «полибуферный ионообменник» [46]. Градиент pH не создается перед тем, как буфер поступает в колонку, а генерируется в самой колонке путем непрерывного добавления кислой формы амфолита. В результате из колонки выходит очень устойчивый градиент pH с низкой ионной силой. Выход белков происходит в их изоэлектрических точках или не-

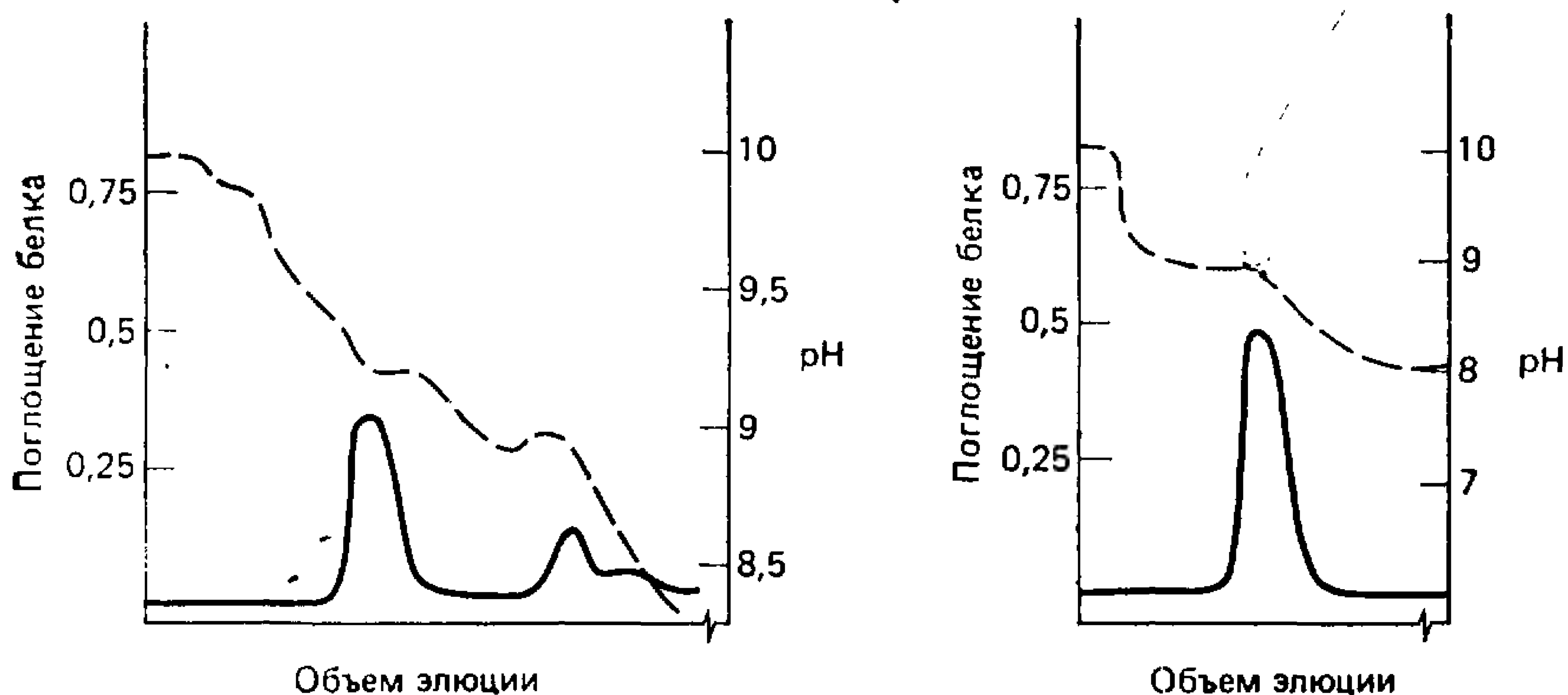


Рис. 4.12. Примеры неупорядоченных градиентов pH, полученных на колонках с ДЭАЭ-сефадексом. После начала элюирования при pH 10,1 были использованы буферы с pH 8,0 (*А*) и 7,5 (*Б*). Значение pH снижается неупорядоченно и резко падает, когда белок (непрерывная линия) полностью выходит из колонки [44].

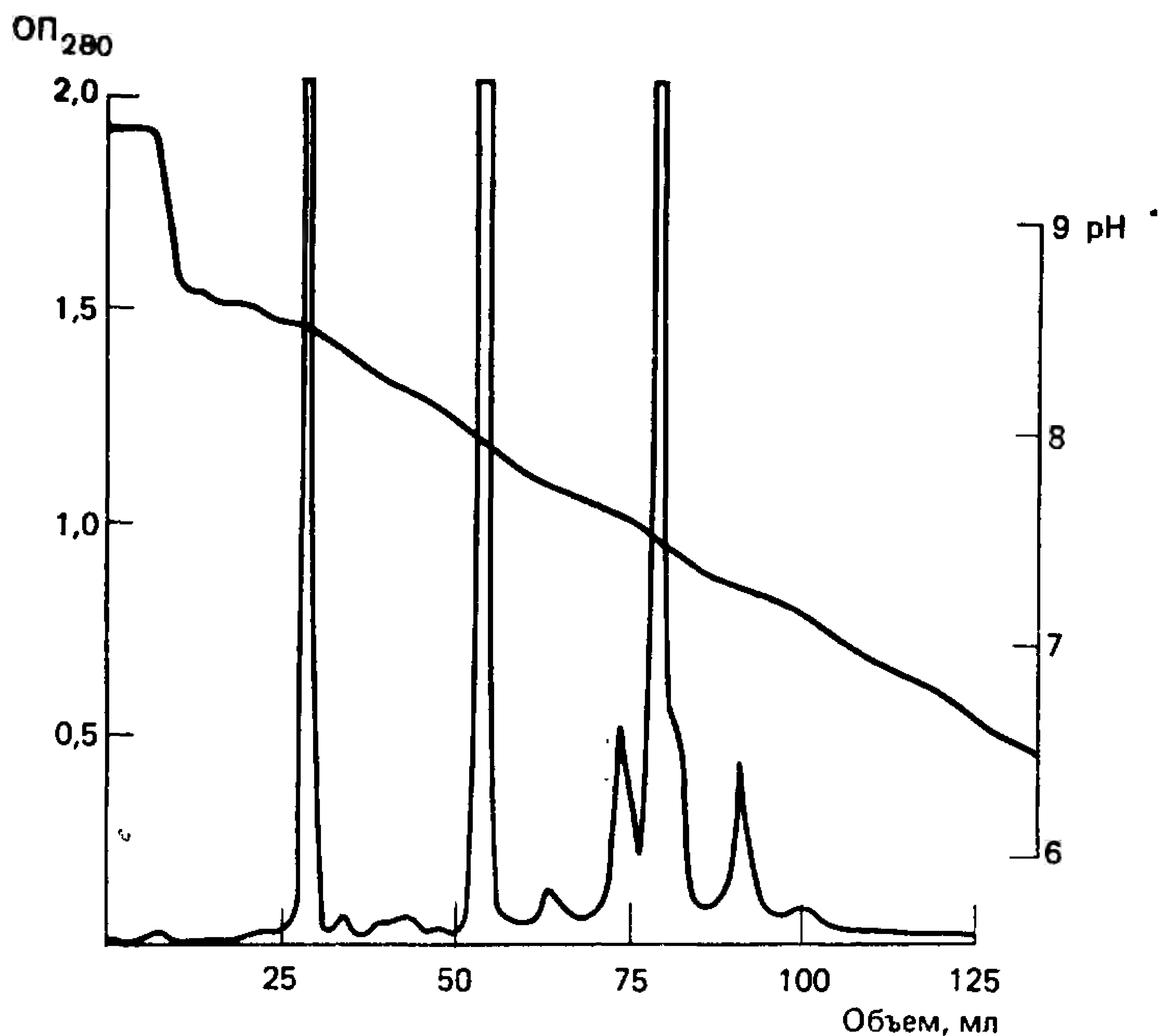


Рис. 4.13. Разделение смеси, состоящей из миоглобина кашалота, миоглобина лошади и карбоксигемоглобина (по 2 мг каждого), с помощью хроматофокусирующей системы. (С любезного разрешения фирмы Pharmacia Fine Chemicals [46].)

сколько выше их. Разрешающая способность метода очень велика, во многих случаях больше, чем при обычном солевом градиенте, о котором речь пойдет дальше. Считается, что каждый компонент может быть полностью элюирован в пределах 0,05 единицы pH, но это, вероятно, оптимум, которого средний белок не достигает. В качестве примеров можно привести белки, хорошо титрующиеся вблизи их изоэлектрической точки, что является необходимым условием для их «изоэлектрического» разделения (рис. 4.13). Несомненно, этот метод элюции даже с использованием обычных ионообменников найдет широкое применение в будущем, хотя при крупномасштабном выделении белков следует принимать в расчет соображения о соотношении эффективности метода и его стоимости.

Солевые градиенты — это самые обычные способы элюции белков с ионообменников. Поскольку изменения pH в колонке можно «поддерживать» за счет буферного действия белков и группировок носителя, соли свободно проходят через колонку, если не обмениваются на противоионы. Но даже в этом случае концентрация соли сохраняется на прежнем уровне, хотя состав ее изменяется. Обычно для получения градиента используют хлориды калия или натрия; линейный градиент создают с помощью простого смесителя (см. рис. 4.19). Можно представить себе два способа действия солей. Соль может непосредственно вытеснять белок; ионы (например, хлорид-ионы в ДЭАЭ-адсорбентах) занимают положительно заряженные центры связывания и блокируют присоединение к ним белков. Можно также предположить, что вся система находится в состоянии равновесия, при котором даже прочно связывающиеся белки какое-то время остаются неадсорбированными; в присутствии ионов соли значительно ослабляется притяжение между свободным белком и адсорбентом. В любом случае десорбированный белок замещается противоположно заряженными ионами, и, следовательно, «ионный обмен» — это точное описание данного процесса.

По мере повышения концентрации соли снижается величина α. При использовании колоночной хроматографии это означает, что белки начинают двигаться вниз, а так как они перемещаются с меньшей скоростью, чем соль, то каждая часть белковой зоны постоянно испытывает действие повышенной концентрации соли. Это приводит к тому, что зоны сужаются. Передняя граница становится резкой под влиянием эффектов, описанных ранее, а также вследствие градации условий по длине колонки, в результате чего потенциальная величина α впереди зоны еще более повышается (рис. 4.14). Задняя граница белковой зоны, находящаяся в условиях отсутствия градиента, должна была бы запаздывать из-за повышения α, но благода-

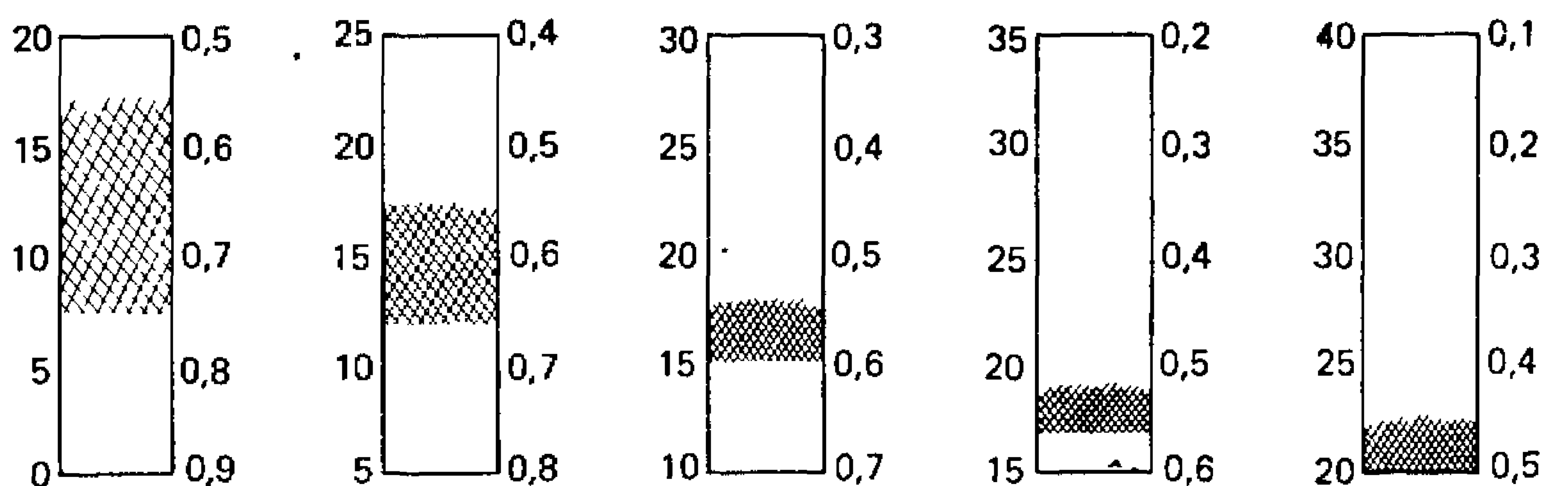


Рис. 4.14. Элюция белков в градиенте соли. *Слева* от каждой диаграммы даны значения концентрации соли в колонке (мМ); *справа* — соответствующие величины α (для простоты изменения α в зависимости от концентрации белка не учитывались). Полоса белка движется быстрее с повышением концентрации соли и выходит из колонки при $\alpha=0{,}5$.

ря более высокой концентрации соли ее перемещение ускоряется. Истинная величина α может не повышаться или даже понижаться непосредственно за основной частью зоны. Эффект сужения зоны под влиянием градиента представлен на рисунках 4.14 и 4.15. Использование ступенчатого повышения концентрации соли для элюции белков описывается в следующем разделе.

4.3. ИОНООБМЕННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ: ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ

Изоэлектрическая точка белков зависит от наличия в их структуре различных ионизируемых остатков аминокислот. По-

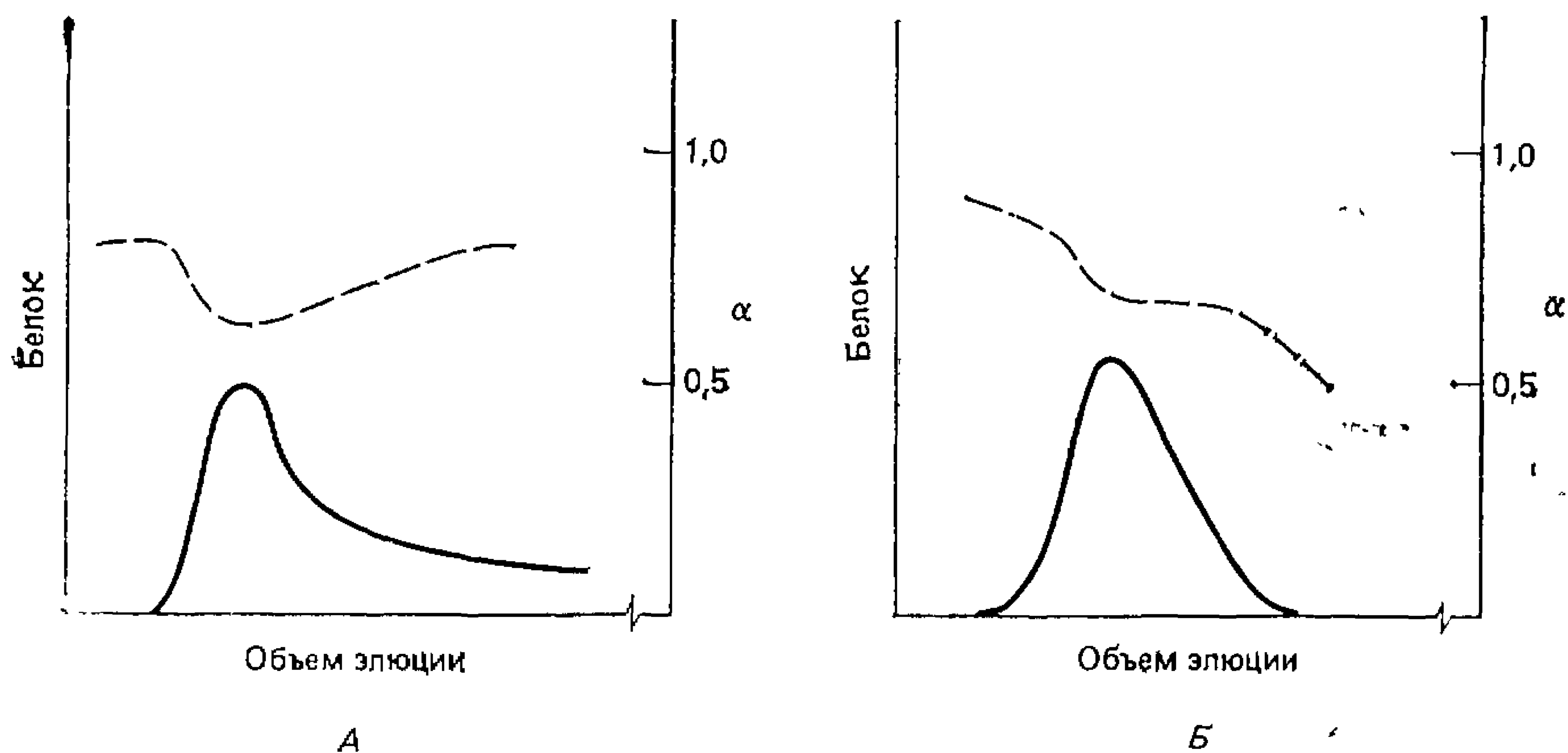


Рис. 4.15. Элюция белка (сплошная линия) в градиенте концентрации соли. Изменение α с концентрацией белка приводит к тому, что без градиента (*А*) наблюдается существенное размывание пика (образование «хвоста»). С градиентом (*Б*) размывания не происходит и элюция осуществляется быстрее.

ложительные заряды несут остатки аргинина, лизина (в основном при pH ниже 9,5) и гистидина (при pH ниже 7,0). Все N-концевые аминогруппы при pH ниже 8 также несут положительный заряд. Если не работать при слишком высоких значениях pH, например при pH выше 8,5, то все остатки аргинина и лизина можно считать положительно заряженными. Отрицательные заряды несут главным образом остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот, и при pH выше 6 практически все эти остатки, а также С-концевые карбоксильные группы ионизированы. При высоких значениях pH (>8) остатки цистеина также ионизируются. Небольшое число остатков, обычно входящих в активный центр фермента, могут быть исключением из общего правила и иметь величины pK_a, отличающиеся от нормы на несколько единиц. Например, в активном центре фермента креатинкиназы расположен ионизированный остаток цистеина с pK_a меньше 7 [47]. В пределах нормальных значений pH, при которых сохраняется стабильность фермента на ионообменной колонке, а именно при pH 5,5—9, различия в величине суммарного заряда в основном создаются за счет остатков гистидина, так как значения его pK_a лежат в пределах 6—7. Следовательно, белок, содержащий мало гистидина, будет вести себя практически одинаково в довольно широкой области pH. В этом случае значение pH не будет иметь решающего значения. Наоборот, суммарный заряд белков с большим содержанием гистидина будет существенно меняться с изменением pH, и значения pH, использованные при адсорбции или элюции белков, будут весьма важны. При значениях pH выше 9 и ниже 5,5 процесс титрования групп белка усиливается, и небольшие изменения величины pH могут значительно повлиять на адсорбцию (на K_p и величину α). Узкая область стабильности ферментов часто ограничивает пределы используемых значений pH, и если изоэлектрическая точка находится вне области стабильности, то, как показано в табл. 4.5, можно использовать ионообменники только одного типа.

Таблица 4.5. Выбор ионообменника для очистки белка с известной изоэлектрической точкой (предполагается, что белок стабилен только при pH 5,5—8,5)

Изоэлектрическая точка	Ионный обмен	pH буфера
8,5	Катион	≤7,0
7,0	Катион	≤6,0
	Анион	≥8,0
5,5	Анион	≥6,5

Однако все это относится к белкам, которые ведут себя идеально и не адсорбируются при значениях pH, не соответствующих их изоэлектрической точке, а их величины α не достигают приемлемого значения (>0,9) до тех пор, пока pH не будет на 1 или 1,5 единицы отличаться от изоэлектрической точки с «правильной» стороны. Существует несколько проверенных случаев, когда эта простая концепция оказывается неверной: белок адсорбируется на катионообменнике даже при pH, значение которого лежит на 1 единицу выше его изоэлектрической точки [48], или, наоборот, на анионообменнике при значении pH на 1 единицу ниже этой точки. Существуют «липкие» белки, которые связываются с ионообменниками обоих типов в одном и том же буфере, и «скользкие» белки, с трудом связывающиеся с адсорбентом в области pH, где фермент сохраняет стабильность. Эти эффекты обусловлены частично неэлектростатическими взаимодействиями, такими, как гидрофобные и вандерваальсовы силы, и частично неравномерным распределением зарядов на поверхности белка. Скопление одинаково заряженных групп, особенно в активном центре, который связывает высокозаряженный субстрат, может привести к адсорбции белка, несмотря на то что суммарный средний заряд последнего имеет другой знак [29]. Этот эффект описан далее более детально в разд. 4.4.

Предварительная проверка поведения белков при ионном обмене

На практике условия адсорбции выбирают эмпирически. Хотя изоэлектрическую точку фермента можно определить, проведя предварительный эксперимент по аналитическому изоэлектрическому фокусированию исследуемого фермента в сочетании со специфическим окрашиванием на ферментативную активность, для этого может быть достаточно и простого эксперимента с применением ионообменников. Чтобы заменить буфер в содержащем фермент препарате, небольшой его образец можно пропустить через гель-фильтрующую колонку. 1 мл препарата пропускают через колонку объемом 10 мл примерно за 10 мин (см. табл. 1.2). Для испытания адсорбционной способности ДЭАЭ-целлюлозы используют 20 мМ трис-буфер, pH 8,0 (о буферах см. ниже). Для этого достаточно небольшой колонки объемом около 2 см^3, предварительно уравновешенной трис-буфером. Если фермент не адсорбировался на ДЭАЭ-целлюлозе, то а) в результате, возможно, произошла значительная его очистка, так как много других белков могли адсорбироваться на ионообменнике, и б) фермент, вероятно, будет адсорбироваться на КМ-целлюлозе. Чтобы проверить последний вывод, во втором эксперименте в качестве буфера используют 20 мМ

N-морфолиноэтансульфонат (МЭС), pH 6,5, и КМ-целлюлозу. Если фермент адсорбируется на обоих ионообменниках (или по крайней мере исчезает из неадсорбированной фракции), следует сразу же обработать колонку 10 М KCl. Такая ионная сила обычно вполне достаточна, чтобы элюировать все белки. Затем проводят проверку, чтобы убедиться, что фермент сошел с колонки. Иногда «адсорбция» фермента на самом деле представляет собой его «инактивацию», поэтому, перед тем как переходить к работе с большими объемами, необходимо определить процент выхода активности.

Следующий этап зависит от результатов предыдущего опыта. Если фермент не адсорбируется ни на одном из использованных ионообменников, это указывает на то, что достигнута высокая степень очистки. Образец можно пропустить через колонки с двумя этими адсорбентами в буфере с промежуточным значением pH, например 7,0. Обе колонки можно соединить вместе или же собрать элюат из первой колонки и довести его pH до нужного значения; последний вариант предпочтителен, так как позволяет не менять самого буфера.

Особенно удобно использовать трис-буфер, с pH доведенным до 8,0 с помощью МЭС, для пропускания образца через колонку с ДЭАЭ-целлюлозой. При этом происходит удаление значительного количества ненужных белков; затем к неадсорбированной фракции, содержащей фермент, добавляют еще некоторое ко-

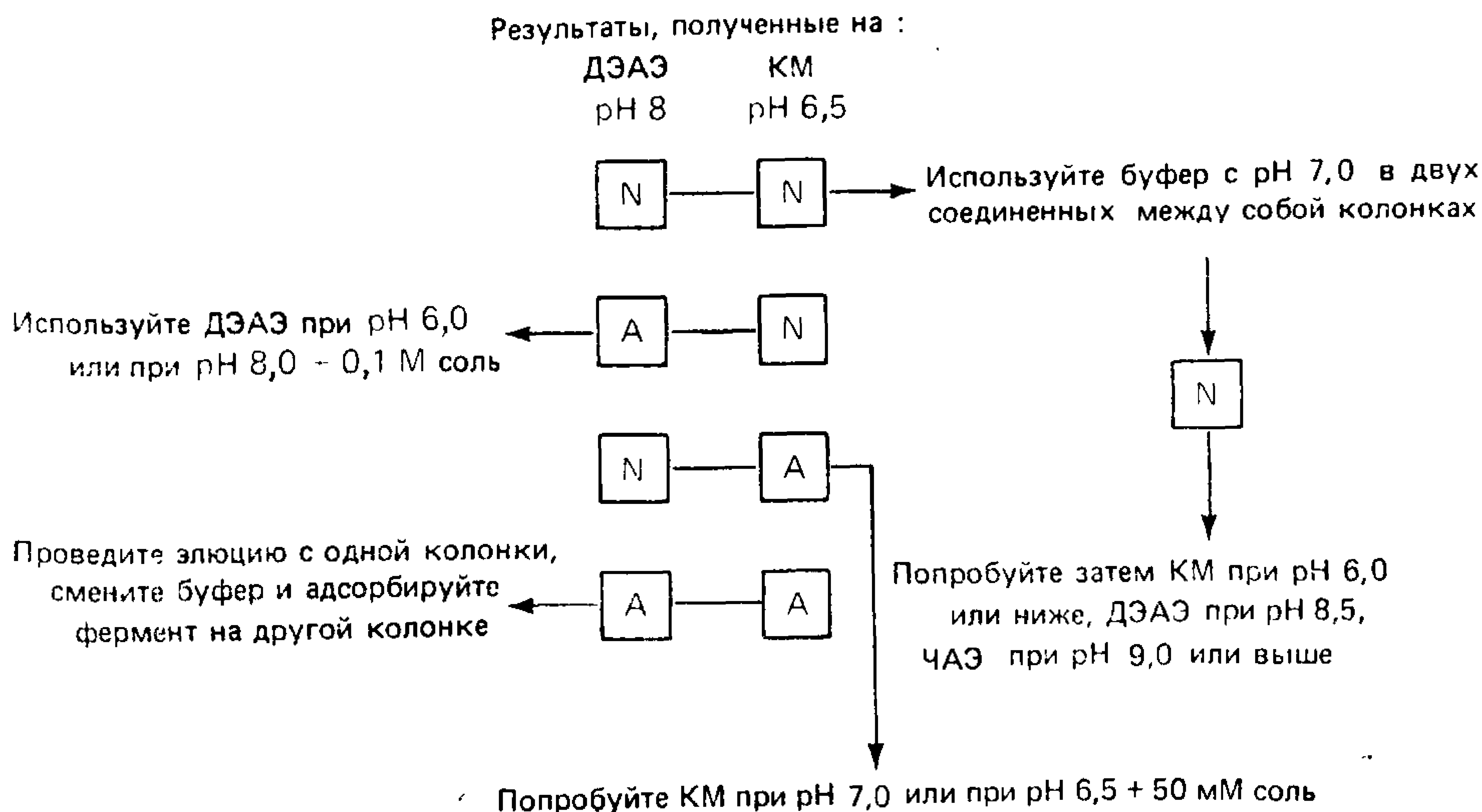


Рис. 4.16. Схема проведения предварительных опытов по адсорбции белков на ионообменниках и последующей их элюции. N — белок не адсорбируется, A — белок адсорбировался.

личество МЭС в кислой форме для доведения pH до 6,5 [49]. МЭС становится теперь главным компонентом буфера, содержащего Н-трис$^+$ просто в качестве противоиона, и образец фермента сразу же наносится на КМ-целлюлозу, на которой он в большинстве случаев адсорбируется.

Если фермент адсорбировался на одной из колонок и был успешно элюирован солевым раствором, имеет смысл уточнить pH, при котором он адсорбируется. Для этого следует проверить, будет ли он адсорбироваться, например на КМ-целлюлозе при более высоком значении pH и на ДЭАЭ-целлюлозе при более низком. В этих условиях может снизиться сорбция других белков. Необходимые для этого буферные растворы описаны ниже. Повышение ионной силы, например добавлением 50 мМ или 0,1 М KCl к буферу при том же значении pH, дает тот же эффект. На рис. 4.16 приведена схема таких пробных опытов.

Буферы, используемые в ионообменной хроматографии

Для успешной работы с белком решающее значение имеет правильный выбор буфера. Поддержание pH в ходе ионообменной хроматографии имеет первостепенную важность, так как ионные взаимодействия сильно зависят от pH, а буферные растворы содержат ионы, которые могут принимать участие в процессе ионного обмена. В большинстве случаев лучше, если буферные ионы не взаимодействуют с адсорбентом, т. е. заряженные формы буфера должны иметь заряд того же знака, что и заместители адсорбента. Если это не так, то могут произойти нежелательные и непредвиденные изменения pH в микросреде, окружающей адсорбированные белки, что повлечет за собой в лучшем случае изменение сил взаимодействия, а в худшем — денатурацию белка. Однако в литературе есть много примеров, когда нарушение этого правила не мешает достижению желаемых результатов; его соблюдение менее важно, если можно использовать высококонцентрированные буферы. Наиболее обычным отступлением от этого правила является использование фосфатных буферов в анионообменной хроматографии; иногда фосфат необходим для поддержания стабильности фермента. Насколько возможно, рекомендуется соблюдать это правило и работать только с простыми анионами (например, Cl^-, ацетат) в экспериментах с ДЭАЭ-адсорбентами и с простыми катионами (например, K^+, Na^+, Mg^{2+}, Н-трис$^+$ при $pH<7$) при использовании КМ-адсорбентов и других катионообменников. Следует помнить, что полианионные комплексообразующие агенты, такие, как ЭДТА, связываются с ДЭАЭ-целлюлозой, накаплива-

ются на адсорбенте и могут конкурировать с белками за центры связывания.

Часто необходимо иметь максимальную буферную емкость при минимальной ионной силе, чтобы обеспечить адсорбцию слабо связывающегося белка. Для того чтобы достичь этого, нужно соблюдать два других правила. Во-первых, величина pK_a буфера не должна отличаться больше чем на 0,5 единицы, а лучше — не больше чем на 0,3 единицы от значения pH используемого буфера. Во-вторых, один из компонентов не должен быть заряжен, чтобы не повышать ионную силу. При работе с ДЭАЭ-целлюлозой (pH 8,0) буфер трис-Cl удовлетворяет всем трем требованиям: противоионом служит Cl^-, pK_a триса равно 8,1 (при 25 °C; см. разд. 6.1) и буфер состоит из Н-трис$^+$ (не взаимодействует с адсорбентом) и триса (нейтральный). Для КМ-целлюлозы при pH 6,5 подходит буфер К-МЭС: противоионом служит K^+, величина pK_a МЭС составляет 6,2 и буфер состоит из Н-МЭС (нейтральный) и МЭС$^-$ (не взаимодействует с адсорбентом). С другой стороны, при использовании фосфата на ДЭАЭ-целлюлозе нарушаются два (по крайней мере) из этих правил, так как здесь имеются противоположно заряженные ионы и ни один из буферных компонентов не нейтрален (HPO_4^{-2} и $H_2PO_4^-$). При использовании фосфата на КМ-целлюлозе нарушается только последнее правило.

Список других возможных буферов приведен в гл. 6 (см. табл. 6.3), другие списки можно найти в литературе (например, [50—52]).

Различные буферы, используемые для ионного обмена, приведены в табл. 4.6. Концентрация ионной и нейтральной форм буфера должна составлять по меньшей мере 5 мМ. Таким образом, при использовании трис-Cl на ДЭАЭ-целлюлозе буфер должен содержать не менее 10 мМ триса, pH которого доведен до значения его pK_a с помощью HCl. Удобнее всего готовить буфер из 10 мМ HCl, доводя его pH до нужного значения незаряженным основанием (в данном случае трисом); преимущество этого способа состоит в том, что ионная сила точно известна (0,01 Н-трис$^+$-Cl^-). При работе с катионообменниками делают наоборот, а именно 10 мМ KOH титруют до нужного значения pH с помощью МЭС. Следует помнить о влиянии температуры на величины pK_a (разд. 6.1), особенно если буфер готовят при комнатной температуре, а используют на холоде. К сожалению, при воспроизведении опубликованных методик редко бывает ясно, в каких условиях доводили pH до нужной величины — на холоде или при комнатной температуре.

Если интересующий нас фермент сильно адсорбируется при низкой ионной силе, можно ее повысить, или добавляя к раствору нейтральную соль (KCl, NaCl), или повышая концентра-

Таблица 4.6. Состав буферов для ионообменной хроматографии[1]

Анионообмен[2]			Катионообмен[3]		
Температура, °С	pH	Буфер	Температура, °С	pH	Буфер
20	8,5—9,2	Диэтаноламин или 2-амино-2-метил-1,3-пропандиол	0—30	3,6—4,3	Молочная кислота
0	9,0—9,7		0—30	4,3—5,2	Уксусная кислота[5]
20	7,8—8,5	Трис[9]	0—30	4,7—5,4	Пивалиновая кислота[5] (триметилуксусная кислота)
0	8,2—8,9		0—20	5,2—5,8	Пиколиновая кислота[7]
20	7,4—8,0	Триэтаноламин	20	5,8—6,6	МЭС[8]
0	7,8—8,4		0	6,0—6,8	
20	6,6—7,3	Имидазол[4]	20	6,3—6,9	АДА
0	7,0—7,7		0	6,5—7,1	
20	6,2—6,8	Бис-трис[10]	20	6,8—7,5	МОПС[8]
0	6,5—7,1		0	7,1—7,8	
20	5,6—6,3	Гистидин[4]	20	7,2—7,8	ТЭС[8]
0	5,9—6,6		0	7,6—8,2	
20	4,9—5,6	Пиридин[5, 6]	20	7,8—8,5	Трицин[8]
0	5,2—5,9		0	8,2—8,9	

[1]) Все перечисленные буферы имеют ионную силу 0,01. Используемые величины pH отклоняются не более чем на 0,4 ед. от pK_a.
[2]) 10 мМ HCl, доведенный до нужного pH оснóвной формой буфера.
[3]) 10 мМ KOH, доведенный до нужного pH кислой формой буфера.
[4]) Образуется комплекс с двухвалентными металлами (особенно гистидин).
[5]) Летучий.
[6]) Токсичный.
[7]) Поглощает в УФ.
[8]) Полные названия цвиттерионных буферов см. в табл. 6.3.
[9]) Трис(гидроксиметил)аминометан.
[10]) Бис(2-гидроксиэтил)имино-трис(гидроксиметилметан).

цию буфера. Последний способ может быть неприемлем из-за высокой стоимости некоторых необычных буферных смесей. Более высокая буферная емкость позволяет надежно поддерживать нужное значение pH и проводить элюцию путем изменения pH (разд. 4.2). (Обсуждение величин pH и состава буферов будет продолжено в разд. 6.1.)

Условия адсорбции

Когда выбран нужный буфер, следует подумать об условиях нанесения белка на колонку, а также о том, каковы должны быть ее размеры при данном количестве белка и какие еще процедуры могут понадобиться. Как правило, наносимая на колонку белковая смесь должна быть растворена в том же буфере, который используют для уравновешивания колонки. Если же в этом нет необходимости, поскольку интересующий нас фермент хорошо связывается с адсорбентом, то тем лучше — не нужно тратить время на перенос образца в определенный буфер. Однако значение pH белкового раствора должно быть идентично pH буфера, уравновешивающего колонку. Желательно также, чтобы ионная сила образца была близка к ионной силе буфера. Существует два способа, с помощью которых можно получить буфер требуемого состава: диализ и гель-фильтрация. Диализ является традиционным методом, и, хотя его проведение занимает много времени, он не трудоемок. В настоящее время чаще используется, особенно при работе с небольшими объемами, обессоливание методом гель-фильтрации. Эти процессы описывались в разд. 1.4.

Теперь образец белка растворен в подходящем для нанесения на ионообменную колонку буфере. Единственное, что остается сделать, это довести концентрацию белка до нужной величины. Даже после удаления солей и других манипуляций концентрация белка может достигать 30 мг·мл$^{-1}$. Это очень высокая концентрация, особенно если на ионообменнике адсорбируется значительная часть белка. Ионы буфера вовлекаются в ионный обмен, и быстрое замещение противоионов молекулами белка может привести к резкому локальному изменению pH и концентрации соли (разд. 4.2). Любые тщательно подбираемые условия должны быть воспроизводимыми; вместе с тем, хотя нанесение образца с высокой концентрацией белка иногда дает хорошие результаты в том или ином конкретном случае, воспроизводимость может оказаться низкой. Часто условия, хорошо воспроизводимые при повседневной работе в одной лаборатории, очень трудно воспроизвести в другой. Поэтому лучше пользоваться методами, не очень сильно зависящими от точ-

ного значения какого-либо одного параметра. Чем больше разведение наносимого на колонку образца, тем более воспроизводимыми будут результаты. Однако работать с сильно разбавленными растворами неудобно, и их использование может породить другие проблемы, особенно если величина α выделяемого фермента ниже 0,95 (см. ниже). Максимально допустимая концентрация адсорбируемого белка составляет 5 мг·мл$^{-1}$ при наличии в смеси неадсорбируемого белка в концентрации 10 мг·мл$^{-1}$. С первого взгляда может показаться странным, что на количество неадсорбируемого белка также накладываются ограничения. Но следует помнить, что неадсорбируемый белок несет противоположно заряженные ионы, которые повышают ионную силу, ослабляя взаимодействия, необходимые в процессе нанесения образца.

Обычно допускают, что в условиях адсорбции белок связывается с верхним слоем адсорбента в колонке и остается там до тех пор, пока не изменяется состав буфера и не начинается процесс элюции. Это действительно имеет место, если $\alpha=1,0$ или очень близко к этой величине. Но иногда невозможно достичь такого состояния. Нужная величина pH может не совпадать с областью стабильности фермента, или выбраны такие условия, при которых снижена общая адсорбция белка в колонке. Представим ситуацию, когда $\alpha=0,90$. В любой точке колонки, достигнутой белком, 10% этого белка остается в растворе и проходит вниз по колонке к следующей точке. Кроме того, определенная доля адсорбированного белка постоянно десорбируется и переносится вниз потоком буфера. В среднем каждая молекула белка двигается вниз по колонке со скоростью, составляющей 10% скорости буфера, поэтому белок начинает выходить из колонки после того, как на нее наносят объем буфера, равный 10 объемам колонки.

Если в наносимой на колонку смеси имеются сильно связываемые белки, то белок с величиной α, равной 0,90, будет перемещаться еще быстрее, поскольку после вытеснения из первоначальных центров связывания в верхней части колонки он окажется в области, где бо́льшая часть центров связывания будет необратимо занята другими белками. Белок будет двигаться с буфером дальше вниз по колонке в область, которую еще не достигли другие белки. Ясно, что в этих условиях объем наносимого буфера не должен значительно превышать объем колонки, и не следует слишком сильно промывать колонку исходным буфером перед началом элюции. При работе со сложными смесями окрашенных белков в верхней части колонки обычно можно наблюдать появление окрашенных зон по мере того, как отдельные компоненты смеси вытесняют друг друга в соответствии с их коэффициентами распределения. Эти зоны

становятся особенно четкими после нанесения всего количества белка и промывки колонки одним или двумя объемами исходного буфера.

Объем и размеры колонки

Минимальная величина колонки, несомненно, определяется концентрацией белка и соотношением объемов колонки и образца. Но более важными параметрами являются фактическая емкость колонки для адсорбируемых белков и длина пути, необходимая для их хроматографического разделения (о последнем параметре иногда говорят, что он эквивалентен определенному числу «теоретических тарелок»). В некоторых случаях, особенно при ступенчатой и аффинной элюции, можно использовать короткую колонку, в которой половину объема занимает первоначальная зона адсорбированного образца. Так как при ступенчатой элюции не требуется полного хроматографического разделения, для снижения диффузии лучше уменьшить «неиспользуемый» объем колонки. Однако при ступенчатой элюции редко встречаются ситуации типа «все или ничего» ($\alpha=1{,}0$ или $\alpha=0$), поэтому на профиль элюции будет оказывать влияние частичное удерживание белков в «неиспользуемой» нижней части колонки. Для более тонкой элюции с использованием градиентов нужна колонка, длина которой в 5—20 раз превышала бы длину колонки, необходимой для адсорбции.

Адсорбционная емкость ионообменников в отношении белков может быть очень высокой, но она зависит от размера молекул. Молекулы небольших белков связываются в количествах, превышающих 100 мг$\cdot$см$^{-3}$, но очень крупные белки (мол. масса $>10^6$) не могут пройти внутрь частиц адсорбента и связываются только с его поверхностью. Поэтому емкость сорбентов для таких белков очень низка (разд. 4.2) [38, 41]. Трудно a priori предсказать, какое количество адсорбента необходимо для первоначальной адсорбции белков. Для сложных смесей можно использовать в среднем 30 мг$\cdot$см$^{-3}$, но распределение компонентов в колонке вполне может быть неравномерным. Помимо эффекта образования окрашенных зон, о чем упоминалось выше, относительно высокая степень эксклюзии (исключения) крупных молекул приводит к тому, что последние занимают бо́льшую часть колонки, чем то же количество белков с небольшим размером молекул. Когда известен состав наносимой фракции в отношении размеров молекул (например, фракция после гель-фильтрации; разд. 5.1), тогда легче можно оценить возможную емкость ионообменника. Пользуясь общими цифрами, приведенными выше, можно подсчитать, что если имеется 1 г белка и ожидается, что половина его адсорбиру-

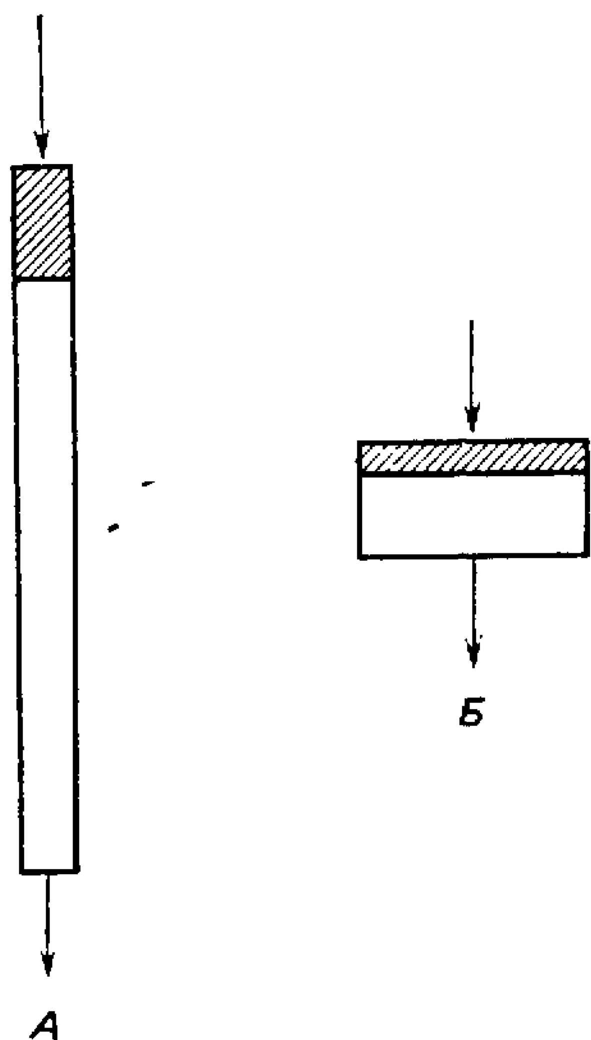


Рис. 4.17. Колонки, имеющие одинаковый объем, но разные пропорции. *А*. Длинная и узкая колонка, в которой белок адсорбируется в верхней части, занимающей 20% объема; она характеризуется относительно низкой скоростью потока, причем неравномерность потока обычно не важна. *Б*. Короткая колонка, для которой характерна высокая скорость потока и быстрое разделение; в данном случае необходим равномерный поток по всему поперечному сечению, в противном случае разрешение ухудшается (см. также рис. 5.9).

ется, то разумно будет нанести его на колонку объемом 50—100 см³ в 100 мл буфера. При этом верхняя часть колонки объемом 15—20 см³ будет занята адсорбированными белками. Эти вычисления относятся к белкам, обладающим значительной адсорбционной способностью, для которых величина α очень близка к 1,0. Если же в смеси содержатся белки с величиной α выше нуля, но ниже 0,95, они будут удерживаться лишь частично и в процессе нанесения распределяться вниз по колонке.

На первых этапах развития ионообменной хроматографии белков использовали очень длинные и узкие колонки. Хотя они идеальны для проведения истинной хроматографии, низкая скорость потока, обусловленная конфигурацией этих колонок, приводит к увеличению времени разделения, что иногда плохо отражается на белках (разд. 7.1). В настоящее время чаще применяются более короткие и широкие колонки, длина которых в 4—5 раз превышает их диаметр. Теоретически при абсолютно равномерном нанесении пробы и столь же равномерном протекании жидкости через колонку ее форма не должна иметь значения, если не учитывать размеров частиц, влияющих на эквивалентное число «теоретических тарелок» (рис. 4.17; см. также разд. 5.1). На практике же трудно получить абсолютно равномерный поток через колонку и более длинные колонки при неравномерном потоке дают более удовлетворительные результаты (при данной линейной скорости потока), но при их использовании требуется больше времени для хроматографического разделения. Для рутинной работы рекомендуются колон-

ки, длина которых в 4—5 раз превышает их диаметр. При ступенчатой элюции применяют еще более короткие ионообменные колонки: их длина должна быть только в 1—2 раза больше диаметра.

При установлении скорости потока всегда следует пойти на компромисс между стремлением добиться совершенного хроматографического поведения белков (при нулевой скорости потока!) и возможностью получить быстрое, хотя и менее тонкое их разделение за минимальное время. Современные материалы настолько хорошо заполняют колонку, что она может работать со скоростью до 100 $см \cdot ч^{-1}$*; однако это слишком высокая скорость для большинства процедур. Желательно, чтобы скорость потока была 10—30 $см \cdot ч^{-1}$, а в некоторых случаях эту скорость нужно снизить еще больше, так как колонка не может работать быстрее из-за большого количества адсорбированного (и иногда выпавшего в осадок) белка в ее верхней части, а порой и из-за вязкости растворов неглобулярных белков. Закупорку колонки вследствие осаждения или денатурации белков можно временно устранить, осторожно разрушив поверхностный слой. Тем не менее этого нужно по возможности избегать. Никогда не следует наносить образец, в котором есть осадок; его надо сначала отцентрифугировать или отфильтровать при тех же pH, ионной силе и температуре, при которых образец будет наноситься на колонку.

Методы элюции белков с ионообменников[1]

Перед тем как приступать к описанию различных методов десорбции белков и вытеснения их из ионообменников, полезно напомнить две ситуации (разд. 4.1) — тривиальную ситуацию, когда $\alpha=0$ и белок проходит через колонку, и промежуточную, когда α значительно больше 0, но существенно меньше 1. При $\alpha=0$ все сходные белки (обычно имеющие тот же заряд, что и адсорбент) проходят сквозь колонку и, если не считать пограничных эффектов за счет различной степени молекулярной эксклюзии, собираются во фракции, объем которой незначительно превышает нанесенный объем. Если требуемый фермент находится в этой фракции, а бóльшая часть белков удерживается на колонке, то это великолепный метод очистки, дающий обычно 100%-ный выход фермента. Хотя при такой процедуре, когда нужный белок не адсорбируется, реализуются не все воз-

* Линейную скорость потока, выраженную в $см \cdot ч^{-1}$, можно пересчитать на объемную скорость (в $см^3 \cdot ч^{-1}$), умножив ее на поперечное сечение колонки в $см^2$.

[1] См. разд. 4.2.

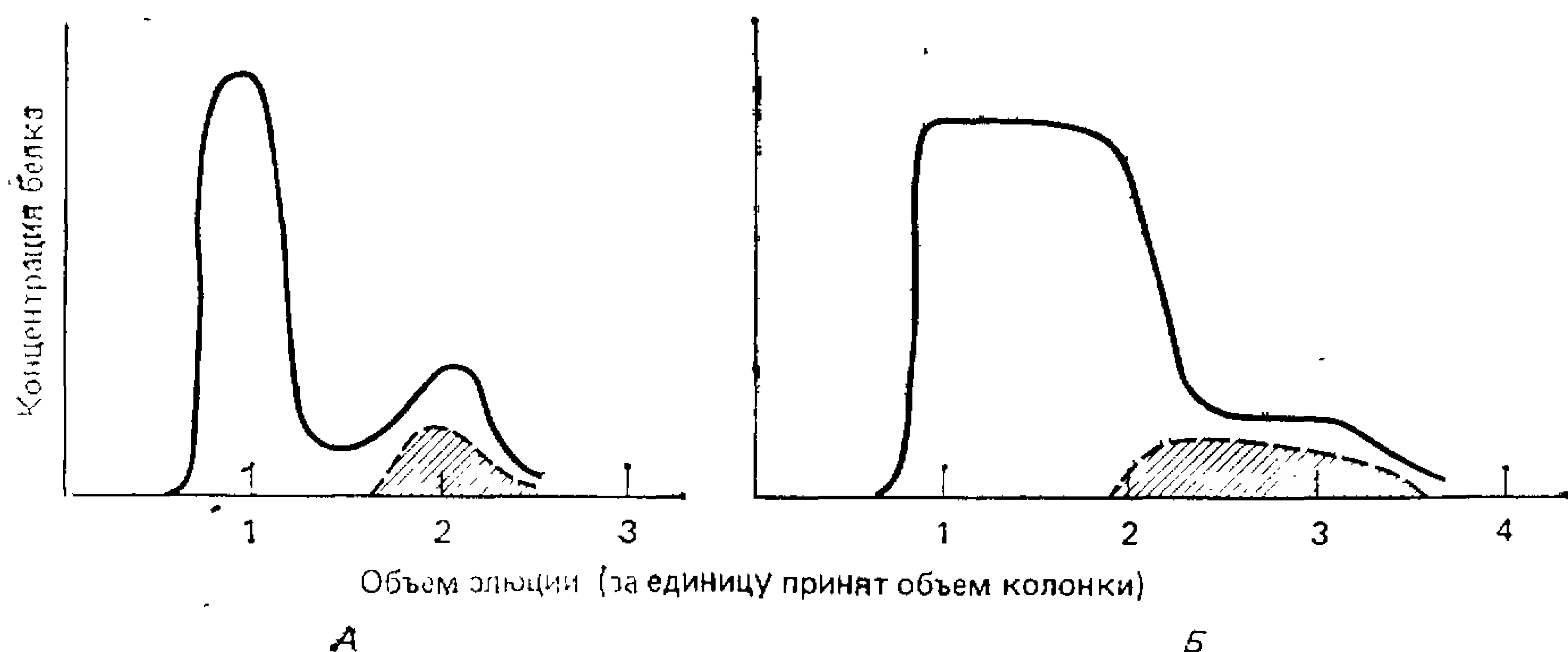


Рис. 4.18. Элюция с ионообменника неадсорбированного ($\alpha=0$) и задержанного ($\alpha=0,5$, заштрихован) белков. *А*. Объем образца составляет менее 0,5 объема колонки. *Б*. Объем образца равен одному объему колонки. Заметьте, что «хвост» неадсорбированных белков при величинах α несколько выше нуля может быть причиной значительного перекрывания пиков в случае *Б*.

можности хроматографии, ее часто используют для снижения общего количества белка, с которым работают дальше.

В промежуточных случаях, когда величина α изменяется от 0,5 до 0,9 (величины ниже 0,5 можно отнести к рассмотренной выше группе, так как бóльшая часть фермента будет элюироваться вместе с неадсорбированной фракцией, если объем наносимого образца не слишком мал, — рис. 4.3), значительная задержка нанесенного фермента может привести к полному отделению его от неадсорбированной фракции, но элюирование все же обычно происходит в исходном буфере. На рис. 4.18 показаны два примера результатов, получающихся при $\alpha=0,5$; разделение в основном зависит от соотношения объемов колонки и наносимого образца. Следует отметить, что общий объем буфера, в котором элюируется фермент, будет по меньшей мере равен объему наносимого образца, даже если не наблюдается образования «хвоста» из-за разброса величин K_P. На практике разброс значений K_P (а следовательно, и α) приводит к тому, что элюирующий объем оказывается даже больше. Тем не менее, если при работе с большим объемом элюированного фермента не возникает трудностей, этот простой хроматографический метод без смены буферов может дать хорошую очистку белков с величиной α больше 0,5, но меньше 0,9.

В большинстве случаев нужный фермент прочно связывается с адсорбентом в процессе нанесения, и для его элюции необходимо сменить буфер. Существуют три способа снижения величины α при использовании ионообменников: а) изменение pH (повышение для катионообменников и понижение для анионо-

обменников; б) повышение ионной силы и в) аффинные методы. Метод *в* детально описан в разд. 4.4; метод *б*, используемый чаще других, применяется как в ступенчатой, так и в градиентной форме. Метод *а*, т. е. изменение pH, можно применять при условии, что буферная емкость нового буфера достаточно высока, чтобы оттитровать молекулы белка и группы адсорбента, которые могут приобрести или потерять заряд в результате изменения pH (разд. 4.2). При ступенчатом методе элюция путем изменения pH может быть весьма успешной. Изменение pH из-за указанного процесса титрования происходит медленнее, чем перемещение фронта нового буфера, но в конечном счете белковый пик выходит из колонки в тот момент, когда pH резко изменяется. При градиентной элюции медленное изменение pH обычно бывает эффективным только в том случае, если буфер обладает высокой буферной емкостью и, следовательно, высокой ионной силой (разд. 4.2).

Важно помнить, что типичная кривая титрования белков становится крутой, если pH ниже 5,5 (или выше 9,5), но при pH 7—8,5 она очень полога. Таким образом, градиенты pH должны охватывать обширную область вблизи нейтральных значений pH, но острый пик белка может быть получен и в узком интервале pH, далеком от нейтральной области. Высокие значения pH обычно не используются вследствие а) недостаточной стабильности ферментов при значениях pH выше 9 и б) отсутствия подходящих адсорбентов. ДЭАЭ-адсорбенты в этих условиях теряют заряд, и лишь немногие белки обладают при таких высоких значениях pH достаточно сильными осно́вными свойствами, чтобы присоединиться к катионообменникам. Некоторые ферменты довольно стабильны при pH 4—6: С ними можно работать при низких значениях pH как на ДЭАЭ-адсорбентах, так и на катионообменниках в зависимости от изоэлектрической точки выделяемого фермента (в связи с этим следует учитывать эффект Доннана, см. рис. 4.11). Хорошим примером служит разделение двух изоферментов гексокиназы дрожжей на ДЭАЭ-целлюлозе при pH 5,6—5,2 [53]. При снижении pH всего лишь на какую-то долю единицы остатки аспарагиновой и глутаминовой кислот протонируются и, следовательно, градиент pH становится очень пологим.

Градиент ионной силы не создает никаких трудностей, связанных с неправильным поведением белков, — повышение концентрации соли на выходе из колонки происходит так же постепенно, как и на входе. Концентрация соли, необходимая для элюции белков, в значительной мере зависит от их изоэлектрических точек, однако некоторые белки остаются обратимо связанными с ионообменниками при I выше 0,5; для их десорбции иногда требуются высокие концентрации соли, но обычно не

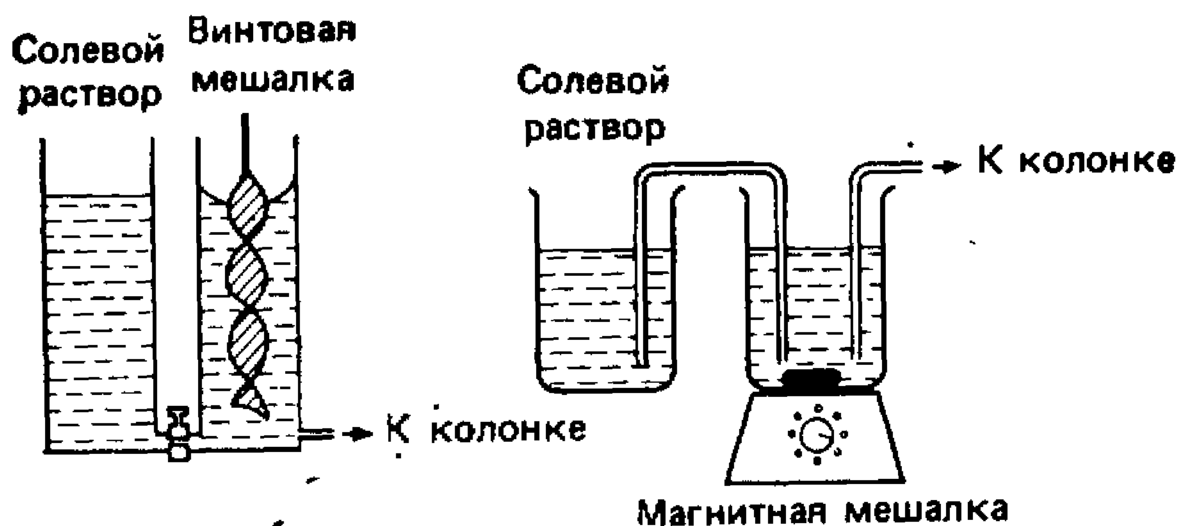


Рис. 4.19. Простейшие смесители для получения градиентов (линейных градиентов).

выше 1 *М*. Высокие концентрации соли, как правило, необходимы при работе с ДЭАЭ-целлюлозой, поскольку изоэлектрические точки белков чаще лежат ниже рK_a остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот (<pH 4,5—5). Ситуации, когда изоэлектрические точки белка оказываются выше рK_a остатков лизина (>pH 10), довольно редки. Суммарный заряд (в нейтральной среде) белков с низкими изоэлектрическими точками может быть довольно высоким, а суммарный заряд белков с высокими изоэлектрическими точками обычно ниже. Редко бывает, чтобы белки оставались адсорбированными на КМ-целлюлозе при нейтральных значениях pH в присутствии 0,2 *М* соли. Фосфоцеллюлоза в этом отношении отличается от других адсорбентов — она ведет себя в какой-то степени подобно аффинным адсорбентам. Часто необходима достаточно высокая концентрация соли, для того чтобы нарушить псевдоспецифическое связывание.

Градиенты (ионной силы или pH) можно создать с помощью простого имеющегося в продаже оборудования, состоящего из двух емкостей, соединенных в нижней части. Емкость, из которой выходит буфер, снабжена лопастной мешалкой. Еще проще использовать два стакана с магнитной мешалкой для перемешивания буферного раствора (рис. 4.19). Намного сложнее миксеры с электронным управлением, которые в основном используют для рутинных, часто повторяемых процедур, а не для разработки новых препаративных методов. Применение этих миксеров позволяет получить любой градиентный профиль. К счастью, без этого оборудования, стоимость которого на три порядка выше стоимости метода с применением двух стаканов, можно вполне обойтись в лаборатории по очистке белков. Однако при использовании последнего метода необходимо иметь магнитную мешалку и насос. Установив смешивающее приспособление для создания градиента над колонкой, можно работать, подавая жидкость самотеком, но лучше пользоваться перистальтическим насосом, обеспечивающим постоянство потока. Выпускаемые насосы различаются как по форме и размерам,

так и, самое главное, по стоимости. Дорогостоящий насос должен обеспечивать возможность непрерывно изменять скорость потока при минимальной пульсации и работать под большим давлением без снижения скорости потока. Однако многие из этих качеств, в частности последнее, не всегда необходимы, так как иногда лучше снизить скорость потока, которому препятствует возрастающее из-за закупорки колонки давление, чем порвать трубки и продолжать качать жидкость на лабораторный стол. Обычно в процессе работы давление *не должно* повышаться, а если это происходит, значит, что-то неисправно. Помимо великолепных насосов, выпускаемых многими фирмами (LKB, Pharmacia, Ismatec), специализирующимися на биохимическом оборудовании, существуют более простые и дешевые модели, пригодные для различных целей.

В заключение приведем некоторые сведения о ступенчатой элюции солевыми растворами. Острые пики, содержащие фермент, могут быть получены при ступенчатом нанесении буферных растворов с более высокой ионной силой — это быстрый и эффективный способ очистки фермента. Однако, из-за того что многие другие факторы, а именно концентрация белка, наличие слабых и сильных центров связывания (разд. 4.1), также влияют на величину α, мало вероятно, что такая простая система элюции даст хорошие результаты. Она может быть эффективной только в том случае, если ступень с измененной концентрацией соли достаточно широка. При значительном повышении концентрации соли вместе с нужным белком могут элюироваться

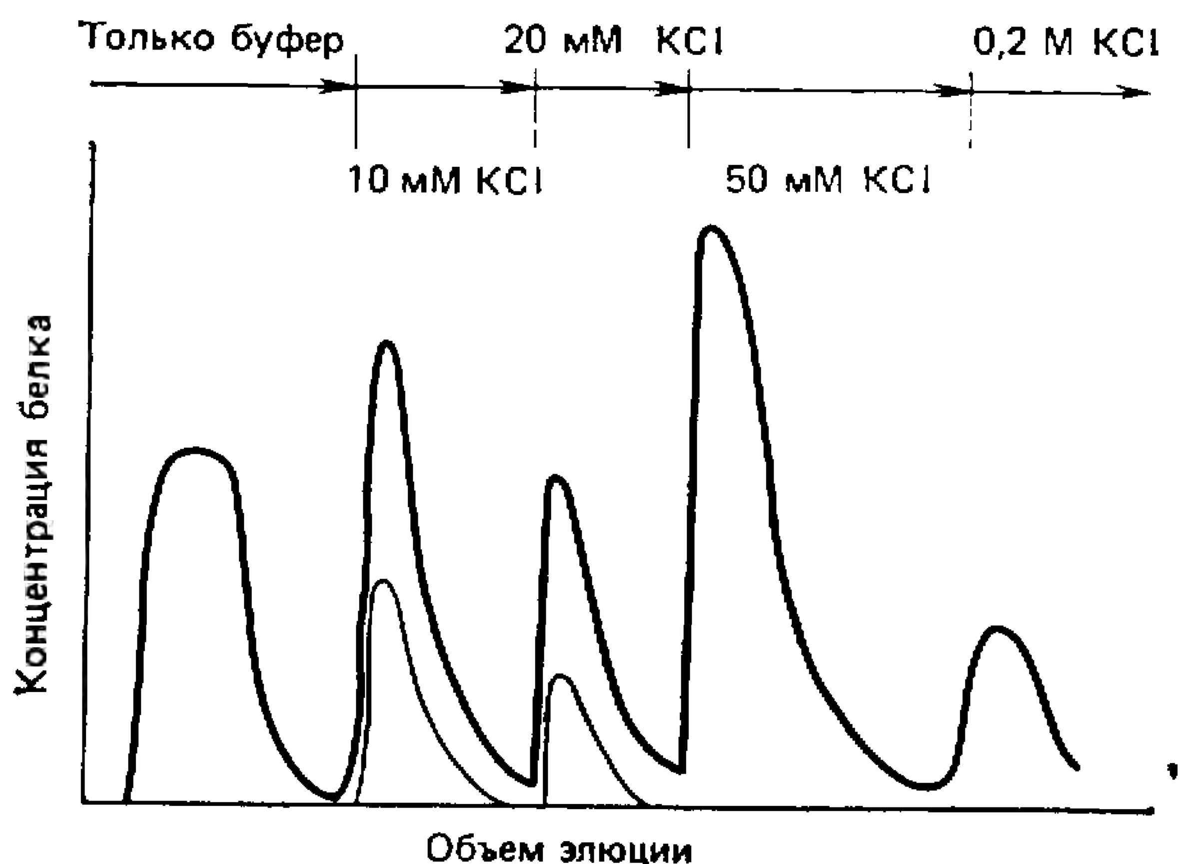


Рис. 4.20. Ступенчатая элюция белков с ионообменной колонки при повышении концентрации соли [29]. Фермент (прерывистая линия) распределяется между двумя пиками, но это не обязательно означает, что он существует в двух формах. Следует отметить четкие передние границы и длинные «хвосты» в пиках элюированных белков (см. текст).

и многие другие белки. Резкое снижение величины α из-за наличия соли приводит к выносу большей части фермента. Однако размывание задней части пика оказывается значительным, и для элюции оставшегося фермента необходимо дальнейшее повышение концентрации соли (рис. 4.20). Появляющийся при этом второй пик не является другой формой фермента — было бы неблагоразумно делать заключение о существовании изоферментных форм на основе процесса ступенчатой элюции. Размывание пика уменьшается при наличии градиента — именно это и служит одной из главных причин столь широкого использования градиентной элюции (рис. 4.15).

В отношении ионообменной хроматографии важно отметить еще несколько моментов. Хотя, согласно простым теориям, условия элюции прямо противоположны условиям адсорбции, на практике часто наблюдается гистерезис. Особенно это характерно для фосфоцеллюлозы, но отмечается также и при работе с другими адсорбентами, такими, как аффинные и модифицированные красителем лигандные адсорбенты (разд. 4.5 и 4.6). Гистерезис означает, например, что величина α, наблюдающаяся при использовании в процессе адсорбции того или иного буфера с определенной ионной силой, будет отличаться от величины α, когда тот же буфер используют для элюции. Так, на рис. 4.21 ионная сила А вполне достаточна для адсорбции, тогда как ионная сила В мала для элюции и слишком велика для адсорбции. Эти эффекты можно объяснить тем, что данные процессы неидеальны и неравновесны; кроме того, здесь действуют и другие факторы, не учитываемые простой теорией.

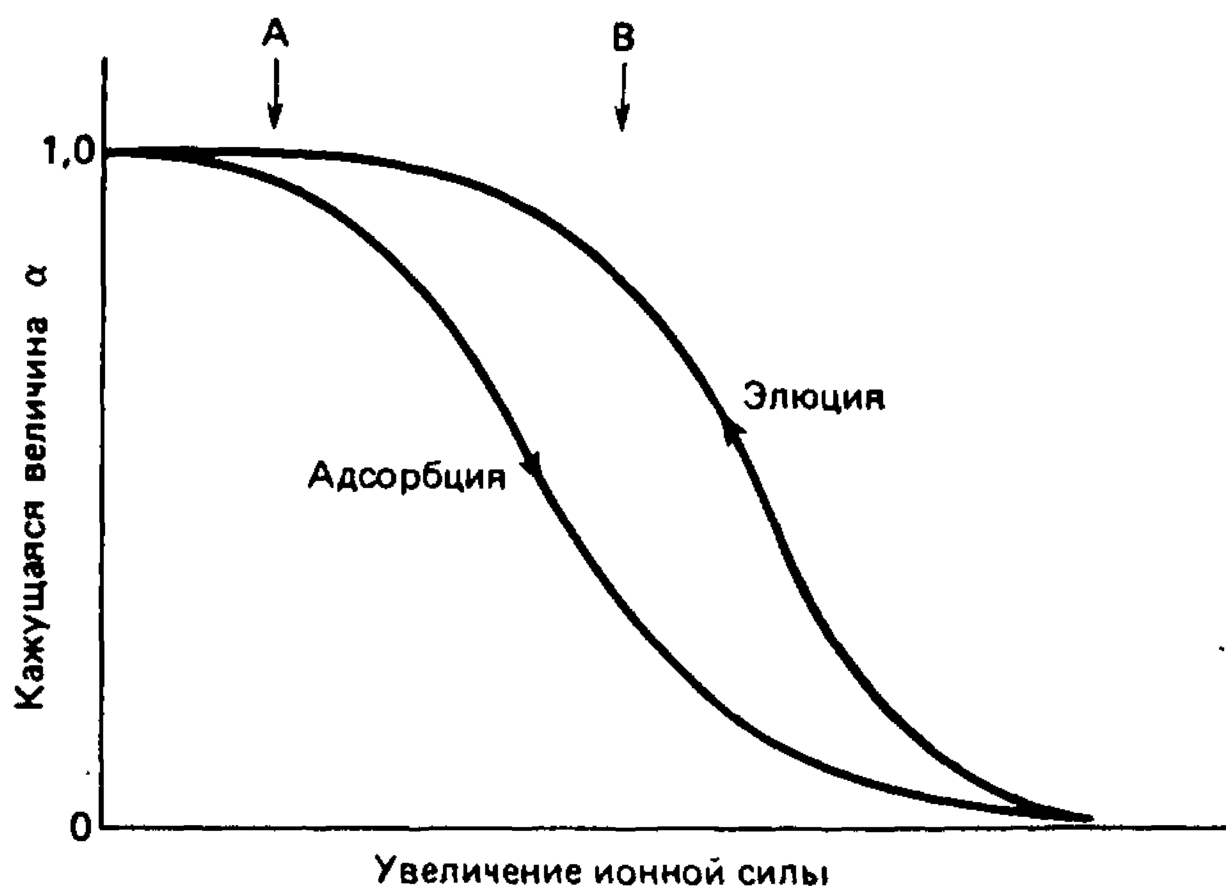


Рис. 4.21. Гистерезис в ионообменной хроматографии. Из-за неравновесности происходящих процессов условия адсорбции несколько отличаются от условий элюции; при этом они более чувствительны к изменениям (см. текст).

Еще одно не менее важное в отношении катионообменной хроматографии наблюдение касается влияния других заряженных полимеров, особенно нуклеиновых кислот, присутствующих в наносимом образце. Электростатическое притяжение между заряженными макромолекулами может быть достаточно сильным при низкой ионной силе, используемой в ионообменной хроматографии, и положительно заряженные белки будут взаимодействовать с отрицательно заряженными нуклеиновыми кислотами. Образовавшийся комплекс несет меньший по величине суммарный положительный заряд или даже может быть заряжен отрицательно и потому не связывается с катионообменником. Простой способ, который можно применить, чтобы избежать этого нежелательного явления, заключается в обработке образца поликатионом (обычно протамином), избирательно осаждающим нуклеиновые кислоты при незначительных потерях белка. Протаминсульфат, используемый в концентрации 1 г на 20—40 г белка, перед добавлением к образцу предварительно растворяют в воде и доводят pH до нейтрального значения, так как этот поликатион обладает сильными кислотными свойствами. Ионная сила не должна быть высокой ($<0{,}1$). Комплексы нуклеиновых кислот с протамином образуются также за счет электростатических взаимодействий, и при высокой концентрации соли распадаются. Если было добавлено достаточное количество протамина, образуется обильный кремово-белый осадок, который можно удалить центрифугированием при умеренной скорости. Во многих случаях делается заключение о том, что катионообменная хроматография непригодна для работы с данным ферментом, так как он «не прилипает» к катионообменнику, тогда как истинная причина неудачи кроется в присутствии нуклеиновых кислот.

4.4. АФФИННАЯ ЭЛЮЦИЯ С ИОНООБМЕННИКОВ И ДРУГИХ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ АДСОРБЕНТОВ

Большинство исследователей под аффинной хроматографией понимают использование иммобилизованного на адсорбенте лиганда, осуществляющего специфический отбор связывающихся с этим лигандом белков (разд. 4.5). После адсорбции фермент может быть элюирован либо неспецифическим образом, например, путем повышения концентрации соли, либо специфическим в результате замещения белка свободным лигандом в растворе. Следовательно, аффинная хроматография может включать две специфические стадии — «аффинную адсорбцию» и «аффинную элюцию». Механизм элюции со специфического адсорбента достаточно ясен. С практической точки зрения присутствие лиганда снижает коэффициент распределения с $\sim 1{,}0$ до значитель-

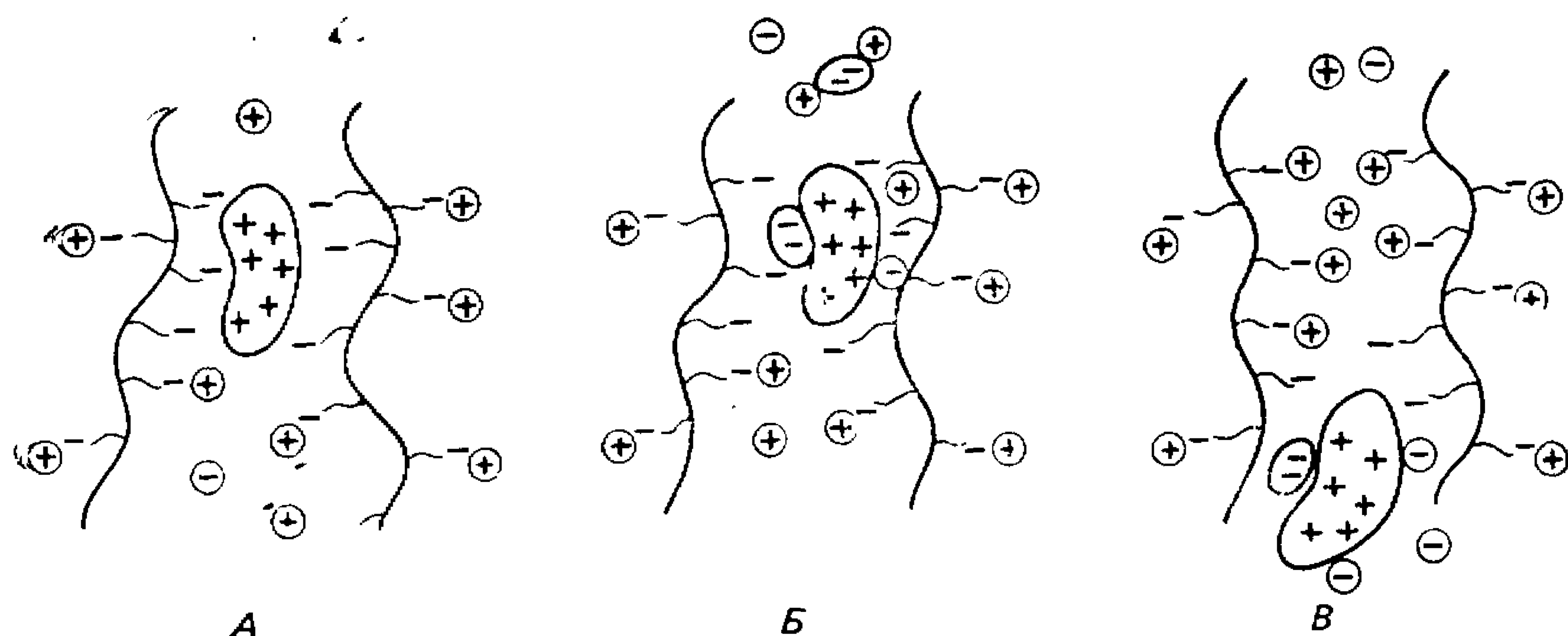


Рис. 4.22. Принципы аффинной элюции с катионообменника. *А*. Положительно заряженный белок адсорбируется на ионообменнике. *Б*. Введен отрицательно заряженный лиганд, который при связывании с белком уменьшает его общий заряд. *В*. Белок элюируется, так как величина α уменьшается благодаря снижению общего заряда белка.

но более низких величин. Однако это может происходить и при использовании других адсорбентов; термин *аффинная элюция* не означает, что сам адсорбент обладает какими-либо особыми свойствами. Аффинная элюция с ионообменников представляет собой очень удобный и специфичный метод очистки многих ферментов, в котором используется определенное сочетание свойств этих ферментов [54—58].

На рис. 4.22, 4.23 и 4.24 схематически представлены основные принципы аффинной элюции с ионообменников. Фермент

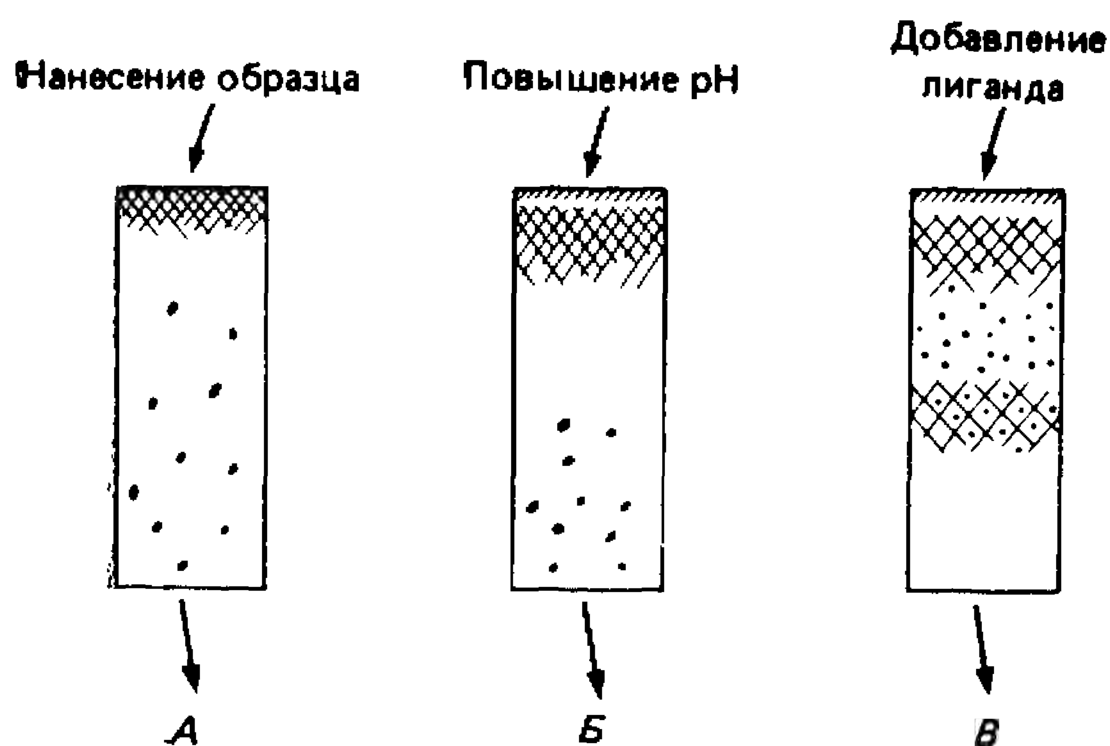


Рис. 4.23. Принципы аффинной элюции с катионообменника. *А*. Наносится смесь белков; нужный фермент адсорбируется, а часть других белков проходит через колонку. *Б*. Величина pH повышается настолько, что фермент начинает двигаться вниз по колонке ($0{,}8<\alpha<0{,}95$); некоторые другие белки могут полностью элюироваться ($\alpha<0{,}8$). *В*. Добавление специфического лиганда приводит к снижению величины α ($0<\alpha<0{,}5$), при этом нужный фермент выходит из колонки.

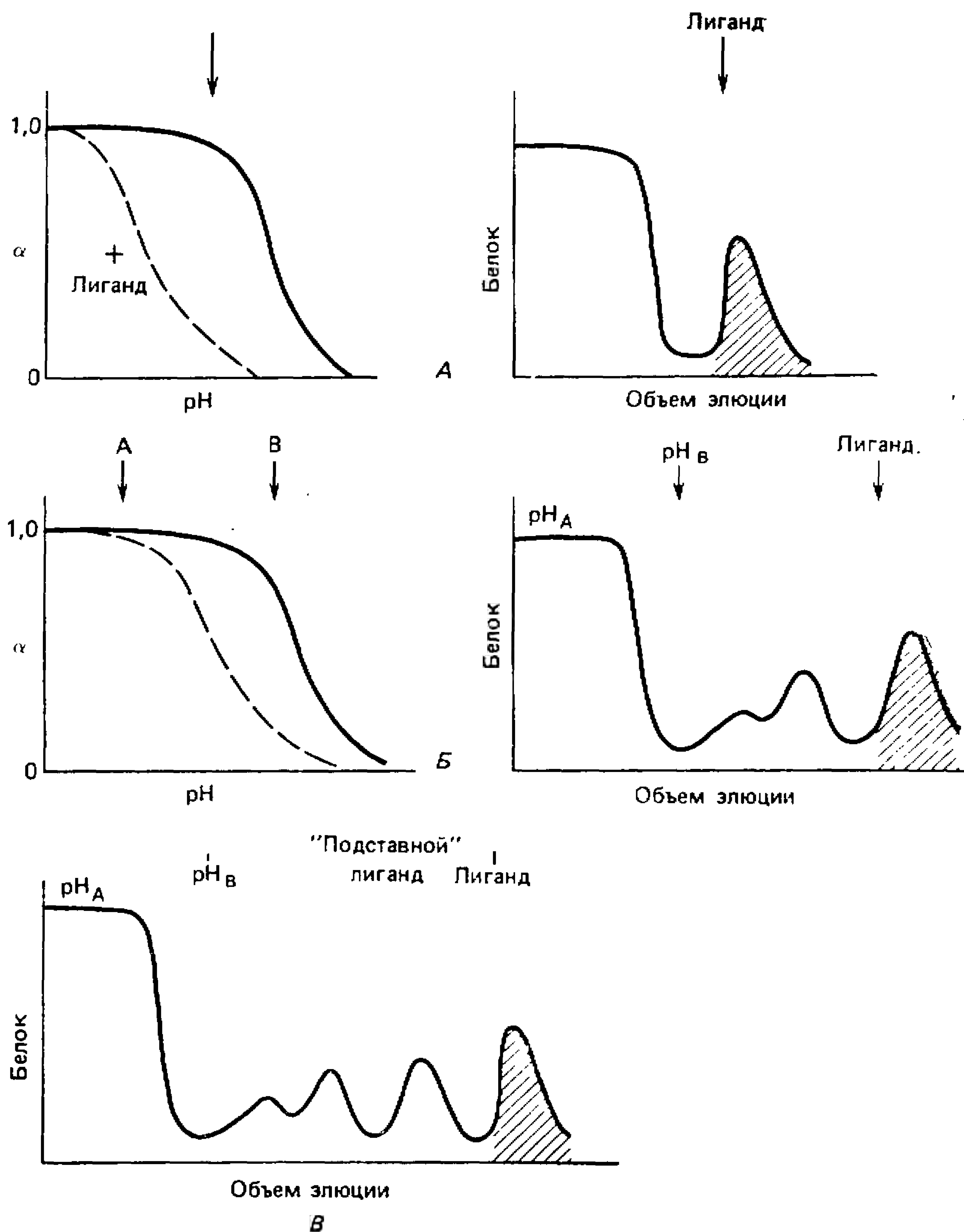


Рис. 4.24. Проведение аффинной элюции. *А*. Образец наносят при том же значении pH, при котором проводят элюцию; влияние лиганда настолько велико, что величина α уменьшается от >0,95 до очень низкой величины. *Б*. Образец наносят при pH_A, когда $\alpha \simeq 1{,}0$, затем повышают pH до B, чтобы снизить величину α примерно до 0,9. В результате добавление лиганда оказывает значительное влияние (как показано на рис. 4.23). *В*. То же, что и на рис. *Б*, но с «подставным» лигандом. На практике «подставной» лиганд можно использовать, когда начинают промывать колонку буфером с pH_B. Заштрихованные пики представляют собой элюированный фермент.

адсорбируется на ионообменнике при определенном значении pH и удерживается на нем с помощью достаточно сильных электростатических взаимодействий между матриксом адсорбента и зарядами белка; при этом коэффициент распределения близок к 1,0. Если фермент связывается с лигандом, несущим заряд, противоположный суммарному заряду фермента, то заряд фермента снижается. В соответствующих условиях снижение суммарного заряда фермента значительно ослабляет электростатическое взаимодействие с адсорбентом, что приводит к существенному снижению коэффициента распределения. В результате величина α может снизиться с 0,95 (когда зона фермента медленно движется по колонке со скоростью, составляющей 1/20 скорости потока буфера) до 0,5 (когда скорость перемещения фермента равна 1/2 скорости перемещения буфера). Это приводит к специфической элюции только одного интересующего нас фермента, за исключением тех случаев, когда с лигандом связываются также другие белки, имеющие сходные адсорбционные характеристики. Первыми белками, к которым был успешно применен этот метод, были фруктозо-1,6-бисфосфат—альдолаза и фруктозо-1,6-бисфосфатаза [54, 55]. В обоих случаях тетрамерный фермент (мол. масса около 150 000) связывает четыре молекулы субстрата, несущих по четыре отрицательных заряда каждая. Поэтому при снижении общего (положительного) заряда на 16 единиц происходит значительное ослабление адсорбции (рис. 4.25). Вычисления, основанные на эксперимен-

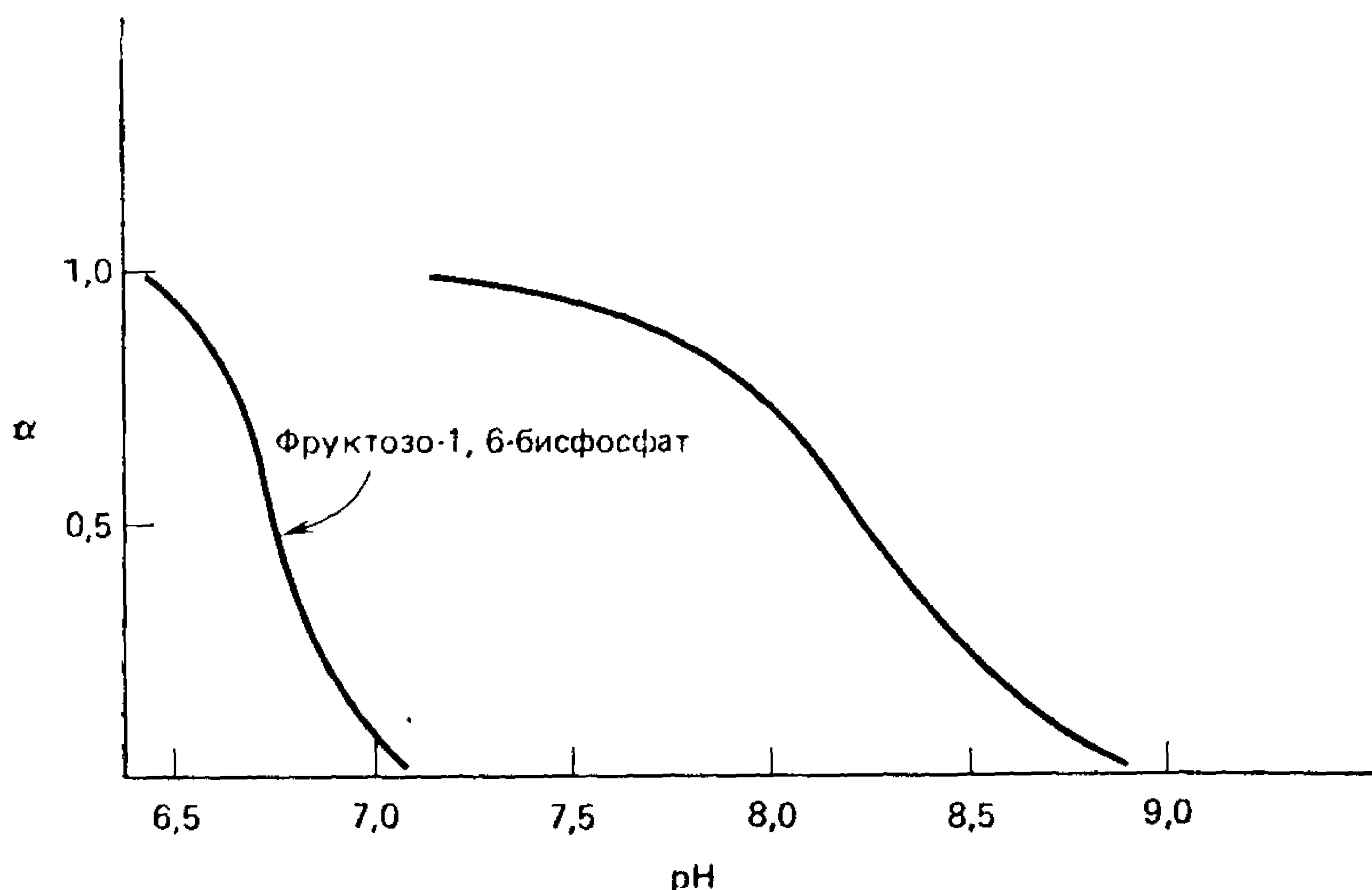


Рис. 4.25. Сдвиг кривой зависимости α от pH для альдолазы кролика в присутствии 0,1 мМ фруктозо-1,6-бисфосфата (ФБФ) [38].

тальных величинах [38], показывают, что в случае альдолазы кролика, связанной на КМ-целлюлозе при pH 7,1, введение дополнительных зарядов вызывает снижение величины α с 0,95 до 0,01. Даже если изначальная адсорбция намного сильнее (например, α=0,995), добавление субстрата приводит к снижению величины α до 0,35. Однако многие ферменты не связывают такое большое число молекул субстрата, к тому же субстраты их могут быть незаряжены. Поэтому можно ожидать, что общий эффект будет слабее, чем в случае с альдолазой.

Детальное изучение адсорбции различных ферментов на КМ-целлюлозе в присутствии субстрата и без него показало, что в некоторых случаях наблюдаемый эффект был больше ожидаемого: в присутствии лиганда кривые зависимости α от pH были сдвинуты в сторону более низких значений pH [38]. При *фиксированном* значении α можно подсчитать общий заряд фермента и комплекса фермент — субстрат, используя два значения pH, соответствующих величинам α на кривых титрования. Для некоторых ферментов было установлено, что указанный сдвиг целиком обусловлен изменением заряда, происходящим при титровании фермента в этой области pH. Например, кривая зависимости α от pH для пируваткиназы из мышц кролика в присутствии 0,1 мМ фосфоенолпирувата сдвигается только на 0,25 единицы pH. Предполагается, что этот тетрамерный фермент приобретает 12 отрицательных зарядов при полном насыщении его субстратом. Однако если pH изменяется на 0,25 единицы, то фермент теряет только восемь положительных зарядов. В этом случае 0,1 мМ фосфоенолпирувата, вероятно, недостаточно для насыщения фермента. С другой стороны, лактатдегидрогеназа, связывая четыре молекулы NADH, приобретает восемь отрицательных зарядов, что соответствует сдвигу pH приблизительно на 0,8 единицы (в области pH 8,5—7,0). Но фактически добавление 0,1 мМ NADH приводит к сдвигу pH на 1,5 единицы, что почти в два раза больше ожидаемого эффекта. Аналогичный эффект наблюдался и в случае фосфоглицераткиназы из дрожжей [48]. Сдвиги при связывании этого фермента с 3-фосфоглицератом или АТР были значительно больше ожидаемых, а с 1,3-бисфосфоглицератом — еще больше.

Можно предложить два других объяснения эффекта аффинной элюции. Помимо того что лиганд снижает общий заряд белка, он связывается с центром, в котором сосредоточены заряды, противоположные по знаку заряду лиганда. Такое связывание может маскировать достаточно специфичное сильное взаимодействие между этими зарядами и адсорбентом. Кроме того, поскольку активный центр фермента расположен, вероятно, близко к поверхности белковой молекулы, заряженные остатки активного центра оказывают более сильное влияние на

общее взаимодействие между белком и адсорбентом, чем другие заряды, расположенные дальше от поверхности молекулы. Маскирование этих зарядов лигандом в значительно большей степени ослабляет указанное взаимодействие, чем потеря равного числа зарядов, беспорядочно распределенных на молекуле белка.

Кроме того, при связывании с лигандом могут происходить конформационные перестройки белка. Известно, что конформационные изменения действительно имеют место [59, 60], и они могут значительно изменить взаимодействие белка с адсорбентом в любом направлении. Убедительных доказательств конформационных изменений, приводящих к *более прочной* сорбции, не было получено, хотя для некоторых ферментов, особенно для енолазы из дрожжей, эффекты, связанные с аффинной элюцией, столь слабы (значительно слабее ожидаемых эффектов при изменении заряда), что такие усиливающие сорбцию конформационные изменения вполне могут существовать. Конформационные изменения, вызывающие *ослабление* адсорбции, по-видимому, действительно имеют место, особенно в случае фосфоглицераткиназы, аденилаткиназы и лактатдегидрогеназы [38, 48].

В общем можно сказать, что аффинная элюция эффективна, если фермент и лиганд обладают следующими свойствами:

а) Фермент адсорбируется, не инактивируясь, на ионообменнике, имеющем тот же знак иммобилизованного заряда, что и используемый при аффинной элюции лиганд. В случае анионообменников (ДЭАЭ) лиганд должен быть положительно заряжен; при использовании же катионообменников (КМ, фосфо и т. д.) лиганд должен нести отрицательный заряд.

б) Лиганд способен связываться с ферментом при таком значении pH, при котором фермент в отсутствие лиганда остается связанным на колонке (на практике при минимальном значении α, равном 0,9).

в) Число зарядов, привносимых лигандом на каждые 10^5 дальтон мол. массы фермента, должно равняться по меньшей мере четырем, если только дополнительное конформационное изменение не будет способствовать элюции.

г) Константа диссоциации лиганда должна быть ниже 10^{-3} М, и чем она меньше, тем лучше.

Из-за ограничений, указанных в пункте *а*, и ввиду того, что практически все лиганды (за исключением ионов металлов) отрицательно заряжены, аффинная элюция с ионообменников осуществляется только применительно к нейтральным и оснóвным белкам, которые адсорбируются на катионообменнике при нейтральных значениях pH (6—8). Аффинная элюция (ионами Mg^{2+}) наблюдалась в процессе очистки пируваткиназы, адсор-

бированной на ЧАЭ-сефадексе при высоких значениях pH (Скоупс, неопубликованные данные). Однако она была очень слабой вследствие ограничений, указанных в пунктах *в* и *г*. Возможно, что по отношению к таким ферментам, как аргининкиназы, очистку которых проводят на ДЭАЭ-целлюлозе, можно более успешно использовать аффинную элюцию (аргинином), хотя положительный эффект ослабляется из-за ограничений, упомянутых в пунктах *в* и *г*. Реже встречаются поликатионные лиганды. У многих ферментов из животных тканей изоэлектрические точки лежат в области, приемлемой для катионообменной аффинной элюции (>pH 6), но соответствующие ферменты растений и микроорганизмов имеют более низкие значения изоэлектрических точек. Поскольку эффективность рассматриваемых методов решающим образом зависит от величины изоэлектрических точек, они являются видоспецифическими. При замене одного вида организма другим может возникнуть необходимость в изменении значения pH буфера для проведения процесса в оптимальных условиях.

Практические этапы аффинной элюции

В этом разделе описываются этапы аффинной элюции. Образец уравновешивают в соответствующем буфере и наносят на ионообменную колонку, заполненную, например, КМ-целлюлозой. Нужный фермент полностью адсорбируется; колонку с нанесенным образцом промывают небольшим количеством исходного буфера. Если эффект аффинной элюции значителен, то pH исходного буфера может быть тем же, что и pH буфера для элюции. Однако чаще pH в колонке повышают до соответствующего значения, при котором нужный фермент только начинает двигаться, например когда $\alpha=0,95—0,90$ (рис. 4.23 и 4.24). Затем на колонку наносят раствор лиганда, концентрация которого должна превышать по величине константу диссоциации комплекса фермент — лиганд, и если фермента много, то общее *количество* лиганда, выраженное в молях, должно быть больше *количества* (в молях) центров связывания. С другой стороны, концентрация лиганда не должна существенно изменять ионную силу буфера. Максимальное количество используемого лиганда часто определяется соображениями стоимости, но если константа диссоциации его комплекса с белком достаточно высока и требуемые концентрации лиганда приводят к повышению ионной силы буфера, то может потребоваться введение стадии «вымывания подставным лигандом». В этом случае на этапе, предшествующем элюции, используют соединение, имеющее тот же заряд, что и лиганд, но не связывающееся с ферментом. Все белки, которые выходят из колонки при повышении ионной си-

лы, удаляются на этом этапе. Теперь колонка подготовлена к аффинной элюции и «подставной» лиганд заменяется настоящим (рис. 4.24, *В*).

Если очистку фермента проводят на анионообменнике, то образец наносят при более высоких значениях pH, а элюцию осуществляют путем снижения pH. Однако следует помнить, что при использовании анионообменников лиганд должен быть *положительно* заряжен. Если добавлен отрицательно заряженный лиганд, эффект будет сложным. Наиболее вероятно, что сам лиганд неспецифически заместит белки в процессе обычного ионного обмена; при этом он свяжется с ионообменником более прочно, чем белки. Кроме того, лиганд специфически свяжется со своим ферментом, но это должно привести (по крайней мере теоретически) к более прочной адсорбции фермента, так как он приобретет при этом еще больше отрицательных зарядов. Была сделана попытка использовать «отрицательную аффинную элюцию», при которой связанный на колонке фер-

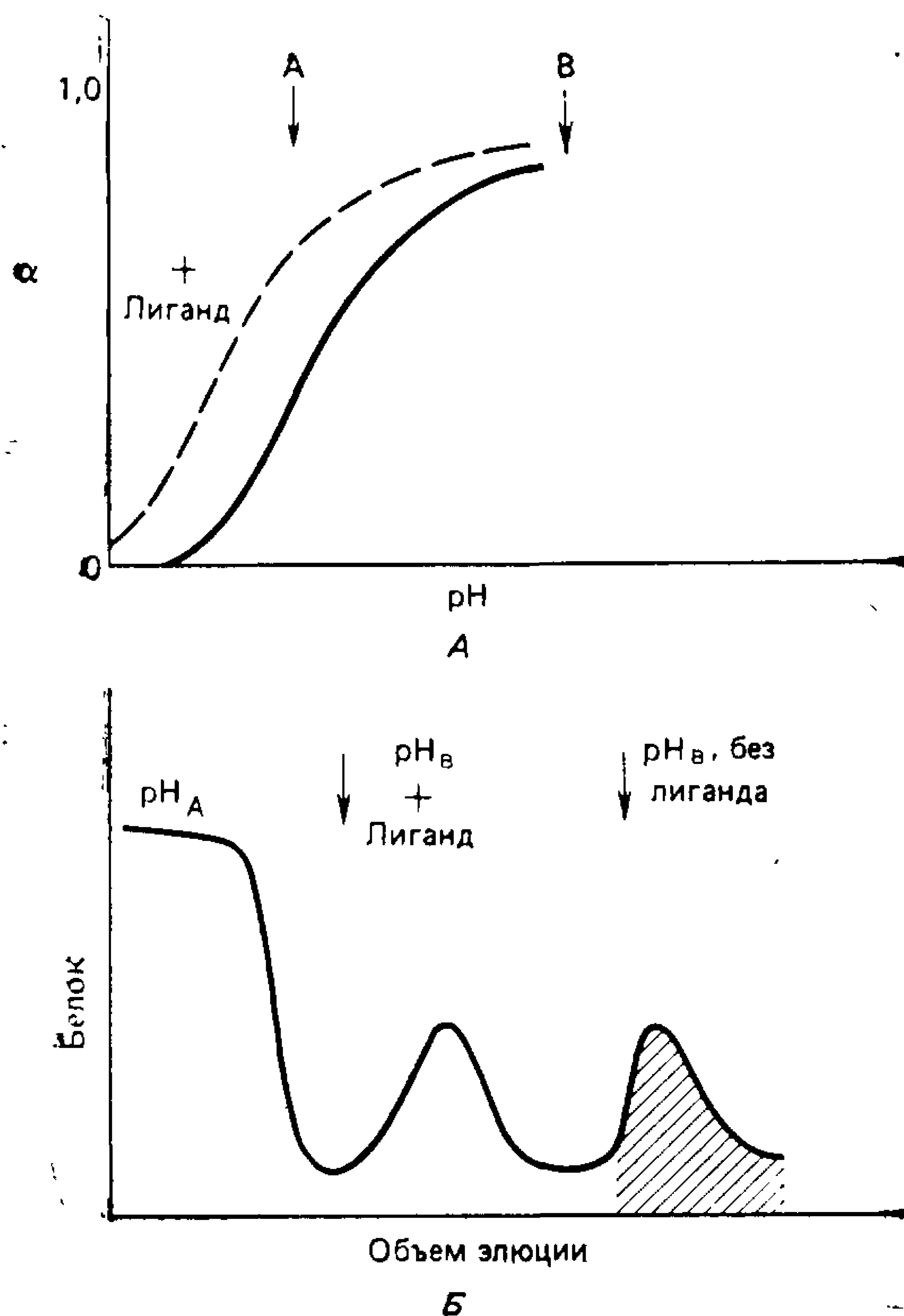
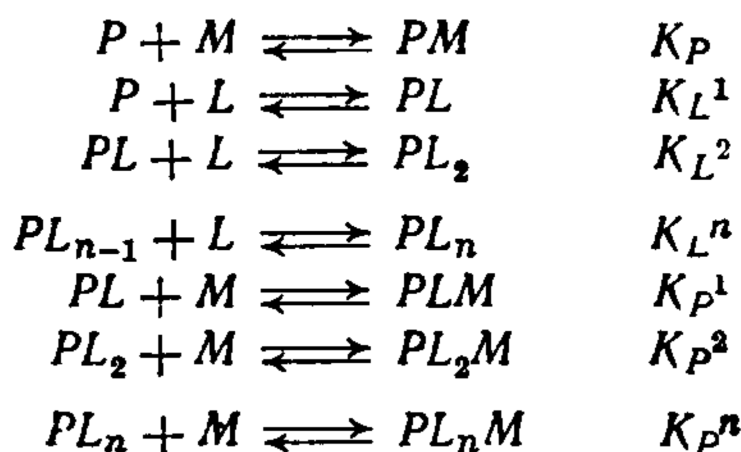


Рис. 4.26. «Отрицательная аффинная элюция» с использованием анионообменника и отрицательно заряженного лиганда. *А*. Кривые зависимости α от pH в присутствии и в отсутствие лиганда. *Б*. Профиль элюции. После адсорбции белков при pH_A величину pH снижают в присутствии лиганда. Неспецифические белки с низкими величинами α при pH_B элюируются. Затем лиганд удаляют из буфера, вследствие чего α для выделяемого фермента снижается (см. рис. *А*) и фермент элюируется (заштрихованная область). Учтите, что лиганд в условиях опыта не должен связываться с адсорбентом.

мент промывают сначала буфером с критическим значением pH в присутствии его лиганда, а затем вымывают в отсутствие лиганда. Этот способ может дать хорошие результаты, если ионные условия таковы, что лиганд адсорбируется на ионообменнике лишь в незначительной степени. Лиганд должен иметь не более одного отрицательного заряда, в противном случае он почти наверняка будет связываться с ионообменником (рис. 4.26).

Некоторые теоретические расчеты

На основе экспериментальных данных, полученных на очищенных ферментах [38], можно провести некоторые расчеты и сравнить их результаты с экспериментальными данными исходя из предположения, что в процессе связывания достигнуто равновесие. Развивая идеи, представленные в разд. 4.1, можно написать следующие равновесия для белка P, связывающегося с n молекулами лиганда L в присутствии адсорбента, имеющего концентрацию эффективных центров связывания, равную M:

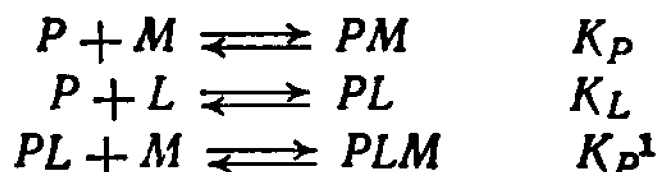


$$
\begin{array}{rcll}
P+M & \rightleftharpoons & PM & K_P \\
P+L & \rightleftharpoons & PL & K_L^1 \\
PL+L & \rightleftharpoons & PL_2 & K_L^2 \\
PL_{n-1}+L & \rightleftharpoons & PL_n & K_L^n \\
PL+M & \rightleftharpoons & PLM & K_P^1 \\
PL_2+M & \rightleftharpoons & PL_2M & K_P^2 \\
PL_n+M & \rightleftharpoons & PL_nM & K_P^n
\end{array}
$$

и

$$\alpha = \frac{[PL]+[PLM]}{p_t}$$

По определению, связывание каждой следующей молекулы лиганда ослабляет взаимодействие белка с адсорбентом, т. е. $K_P^n > K_P^{n-1} > \ldots > K_P^1 > K_P$. Так как практически невозможно определить промежуточные величины K^i_P, целесообразно рассмотреть только два случая. Во-первых, когда $n=1$, можно измерить величину K^1_P, используя величину α при насыщающей концентрации L (рис. 4.27). Вот пример моновалентного фермента:



$$
\begin{array}{rcll}
P+M & \rightleftharpoons & PM & K_P \\
P+L & \rightleftharpoons & PL & K_L \\
PL+M & \rightleftharpoons & PLM & K_P^1
\end{array}
$$

Значение $\alpha = \dfrac{[PL]+[PLM]}{p_t}$ будет корнем кубического уравнения с известными коэффициентами K_P, K_L, K^1_P, l (= концентрации L), m_t и p_t. Наоборот, зная величины K_P, K^1_P (исходя из α_0, α_1; рис. 4.27), l, m_t и p_t, можно из зависимости α от l определить K_L, константу диссоциации комплекса фермент — лиганд. Следует отметить, что l — концентра-

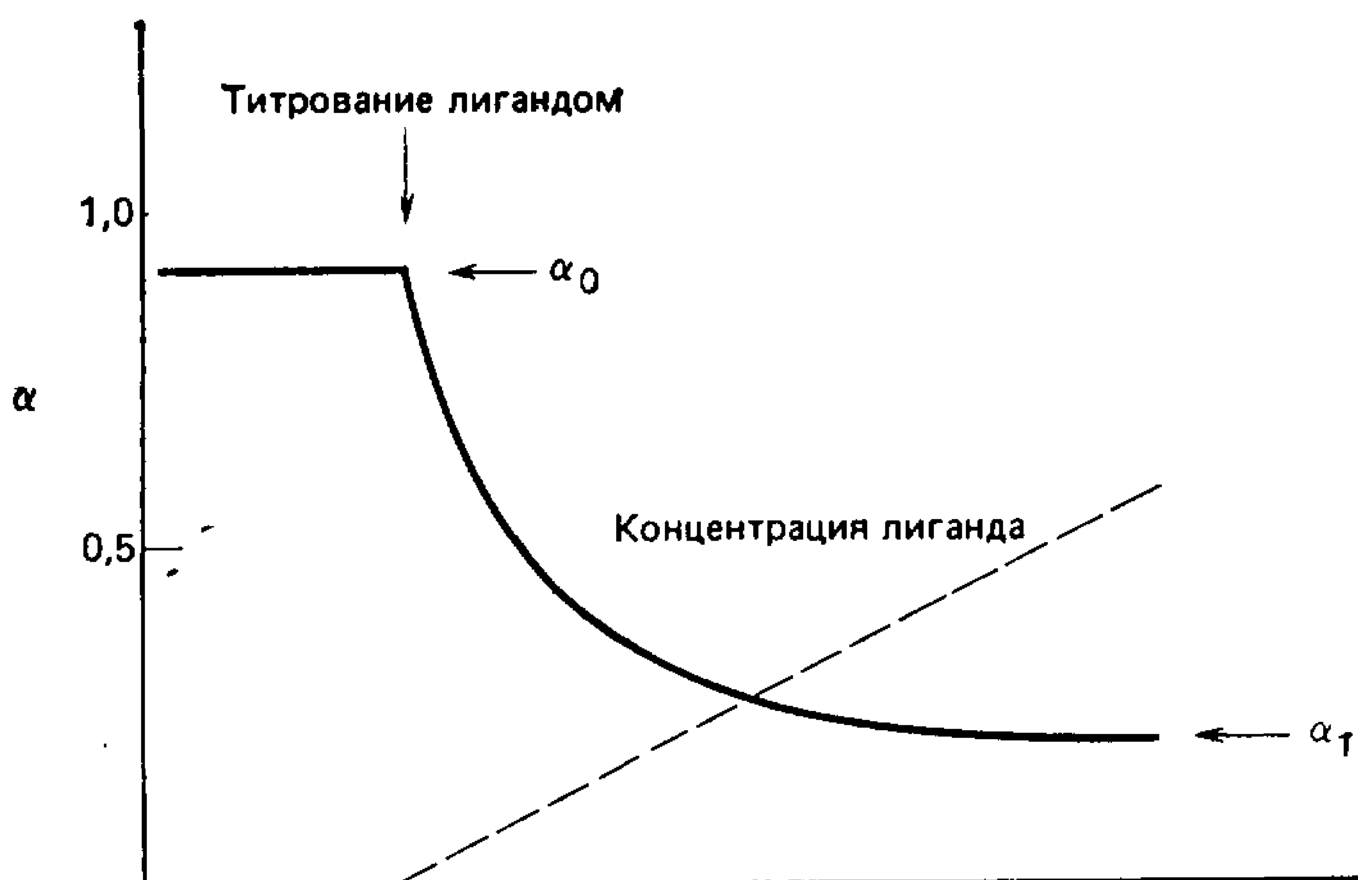


Рис. 4.27. Титрование лигандом смеси фермента с адсорбентом и определение величины α (методы см. [38]). Велнчину K_P можно рассчитать, подставив величины α_0 и m_t в уравнение (4.6). $K^1{}_P$ можно вычислить исходя из величин α_1 и m_t.

ция свободного лиганда, а не общая его концентрация. Поэтому можно определить величину K_L, если фермент имеет только один центр связывания с лигандом, и величина α измерена при фиксированном значении pH и изменяющихся значениях l (как на рис. 4.27). Однако возникают сложности, обусловленные тем, что K_P и $K^1{}_P$ — это не истинные величины, а лишь средние значения непрерывного ряда величин для данных условий.

Если существует несколько центров связывания, то, хотя анализ кривой $\alpha \div L$ теоретически позволяет определить индивидуальные константы диссоциации неполностью насыщенных форм, практически невозможно получить их точные величины. Но можно сделать некоторые вычисления для второго случая, когда все $K^l{}_P = \infty$. Эти расчеты показывают, в какой степени вытеснение белка из адсорбента зависит от соотношения между концентрацией лиганда и его константой диссоциации, а также, в частности, насколько более эффективное действие при аффинной элюции оказывает наличие множественных центров связывания, если используется низкая концентрация (свободного) лиганда. В присутствии многих центров связывания с белком связывается больше лиганда, но *общее* его *количество*, необходимое для заданного снижения величины α, уменьшается. Следовательно, к вышеперечисленным свойствам белка, необходимым для успешного проведения аффинной элюции, следует добавить еще одно желательное (хотя и необязательное) свойство — наличие многих центров связывания.

Уравнение для α в отсутствие лиганда в зависимости от p_t, m_t и K_P было дано выше (4.5):

$$p_t\alpha^2 - (p_t + m_t + K_P)\,\alpha + m_t = 0.$$

Если лиганд L (концентрация l, константа диссоциации K_L), связываясь с белком, полностью вытесняет его из адсорбента (т. е. $K^l{}_P = \infty$),

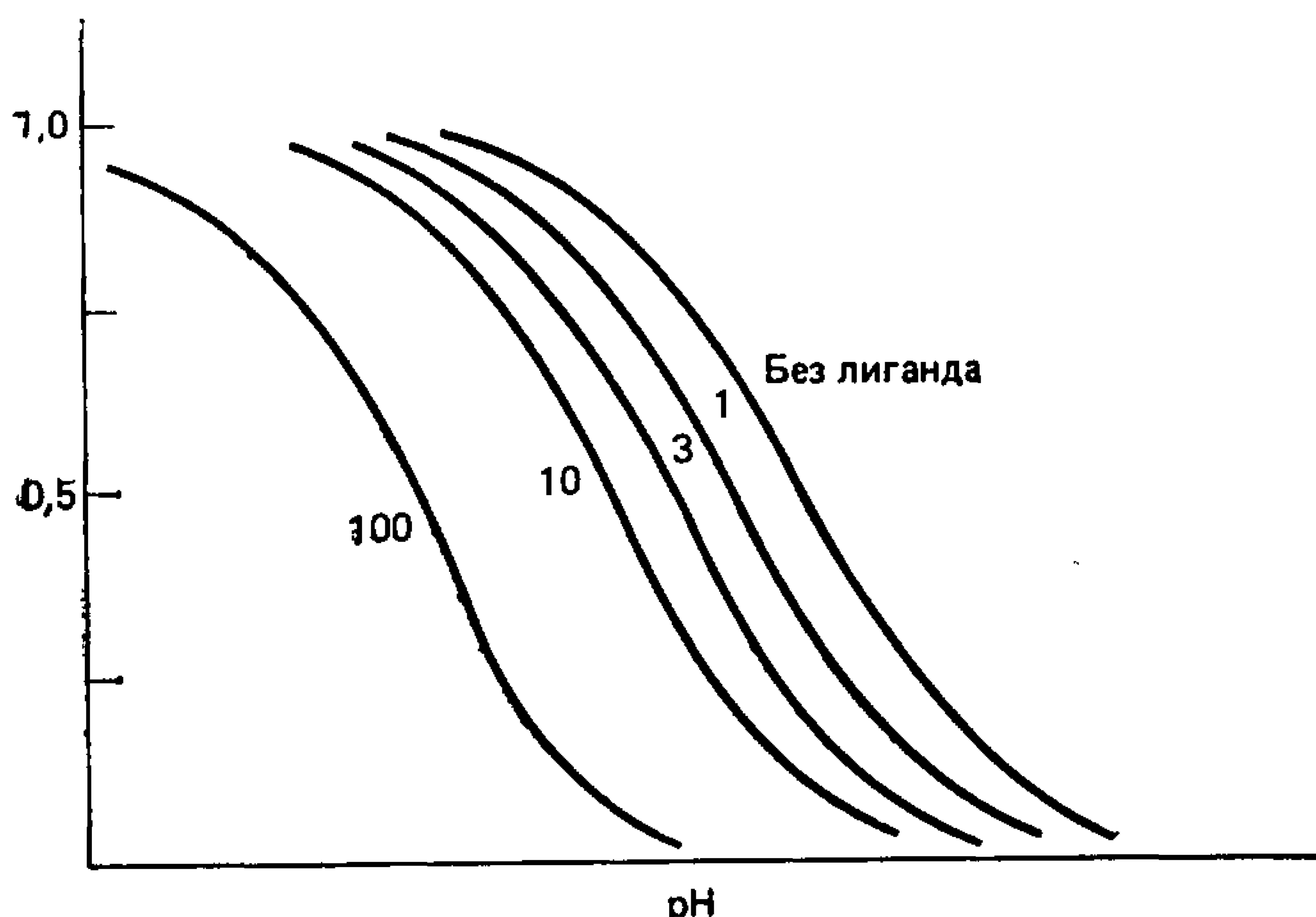


Рис. 4.28. Различные кривые зависимости α от pH (для катионообменника) в присутствии лиганда, рассчитанные для взаимодействия моновалентного фермента с лигандом из уравнения (4.9). Предполагается, что а) сдвиг, индуцируемый лигандом, происходит только вследствие увеличения заряда и б) суммарный заряд белка линейно зависит от величины pH в этой области. Кривые справа налево отвечают концентрациям лиганда, превышающим K_L соответственно в 0, 1, 3, 10 и 100 раз.

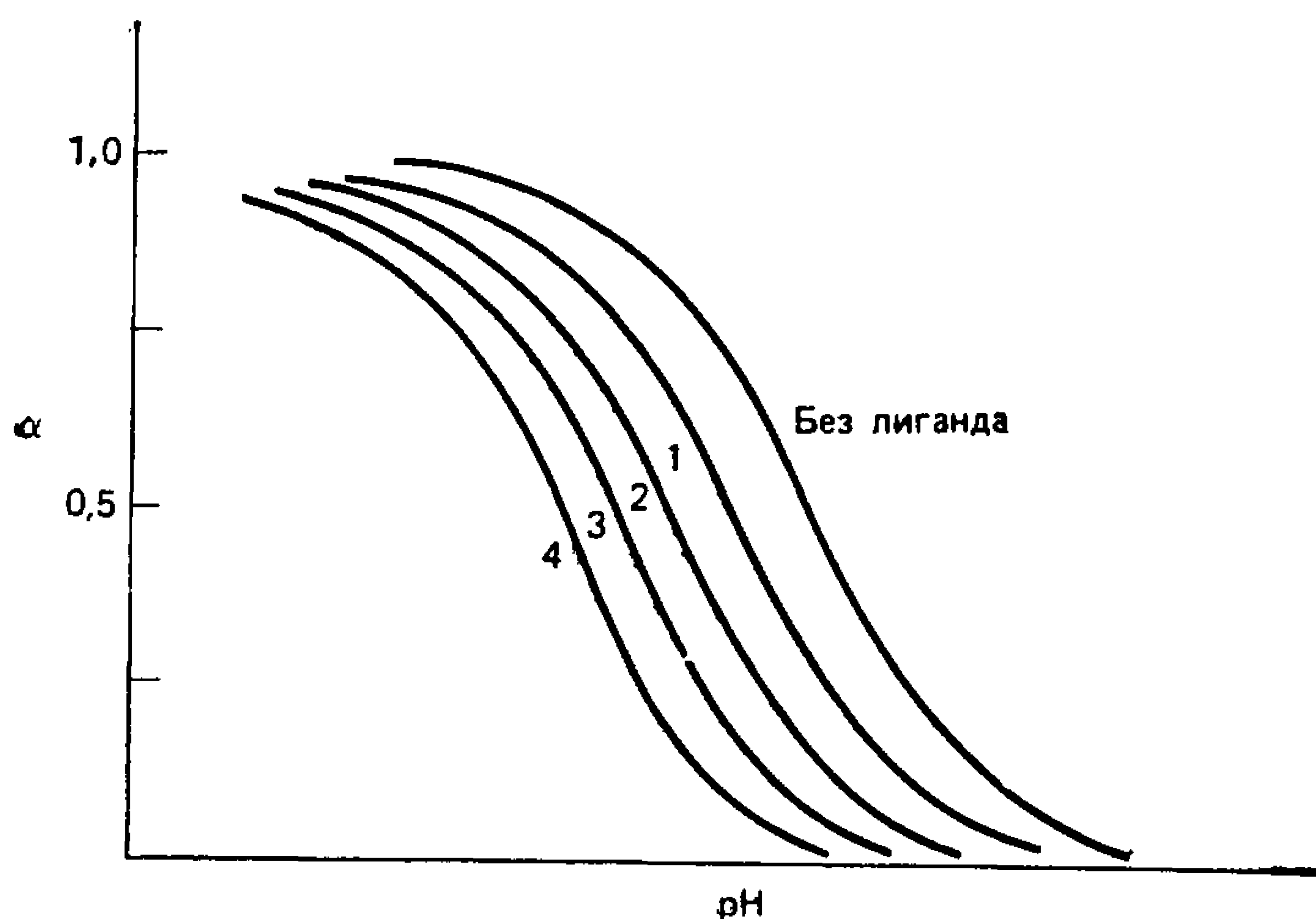


Рис. 4.29. То же, что и на рис. 4.28, но для поливалентных ферментов. Кривые 1, 2, 3 и 4 показывают величину α для ферментов с 1, 2, 3 и 4 центрами связывания для лиганда L, концентрация которого в каждом случае в 2 раза превышает величину K^i_L.

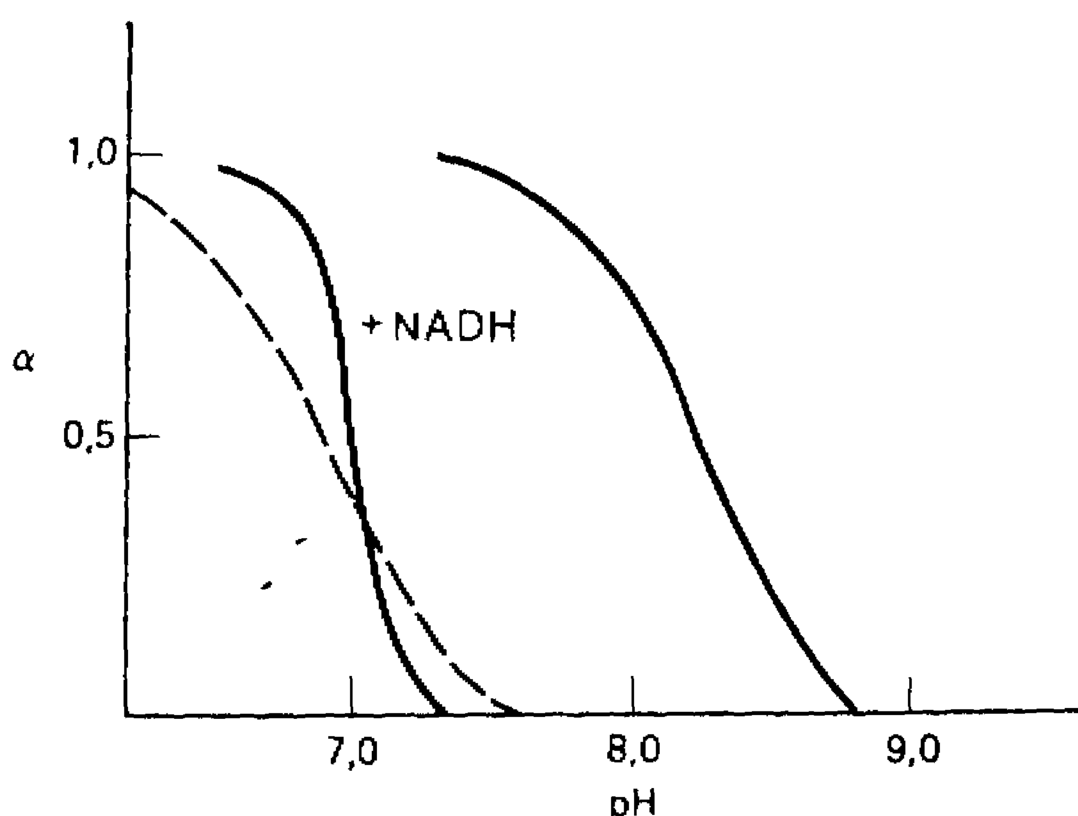


Рис. 4.30. Сдвиг кривой зависимости α от pH для лактатдегидрогеназы в присутствии NADH [38]. В данном случае сдвиг обусловлен не только введением заряда, но и в некоторой степени конформационными изменениями. Показана также теоретическая кривая (прерывистая линия) при $K^i{}_P = \infty$.

то новая величина α при концентрациях, близких к насыщению, выразится уравнениями

$$p_t\alpha^2 - \left[p_t + m_t + K_P\left(1 + \frac{l}{K_L}\right)\right]\alpha + m_t = 0 \qquad (4.9)$$

для мономера и

$$p_t\alpha^2 - \left\{p_t + m_t + K_P\left[1 + \prod_{i=1}^{n}\left(\frac{l}{K^i{}_L}\right)\right]\right\}\alpha + m_t = 0 \qquad (4.10)$$

для *n*-мера, если *все* величины $K^i{}_P$ бесконечны.

На рис. 4.28 и 4.29 даны кривые α/pH, рассчитанные для разных условий. Следует отметить, что кривые сдвинуты в сторону более низких значений pH, но *форма* кривых не меняется. Это относится как к белкам с многими центрами связывания, так и к мономерам. Для типичного тетрамера сдвиг pH становится значительным, как только l превосходит K_L, потому что выражение $[1+\prod_{i=1}^{n}(l/K^i{}_L)]$ быстро растет.

В действительности необходим более сложный анализ, так как pH снижается, а величины $K^i{}_P$ не бесконечны. Однако качественно можно видеть, что конечное значение величин $K^i{}_P$ приводит к более сильной адсорбции, поэтому величины α обычно бывают выше теоретически предсказанных (рис. 4.28) в *области более низких значений* pH. Следовательно, в присутствии лиганда происходит более резкое возрастание реальной величины α в ответ на изменение pH, чем это показано на рис. 4.28. На рис. 4.30 представлены результаты эксперимента с лактатдегидрогеназой и дана соответствующая теоретическая кривая при $K^i{}_P = \infty$.

Аффинная элюция с других неспецифических адсорбентов

Фосфоцеллюлоза представляет собой один из ионообменников, применявшихся во многих опубликованных работах по проведению аффинной элюции. Однако при использовании фосфоцеллюлозы наблюдаются специфические эффекты, особенно ес-

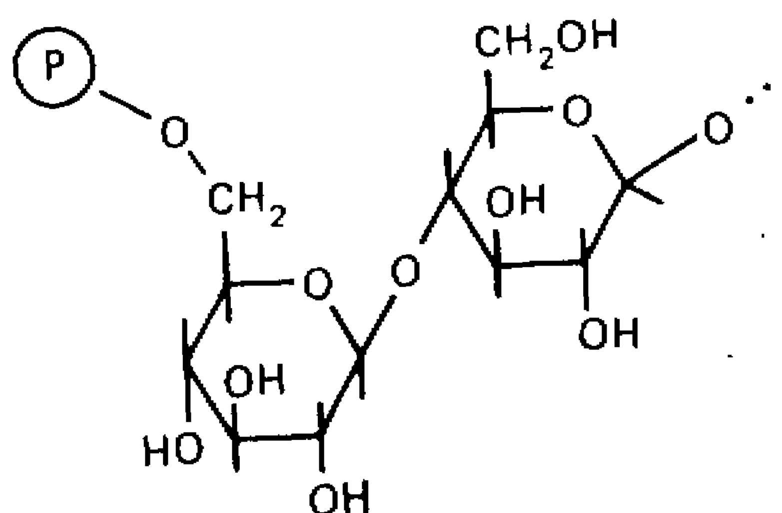
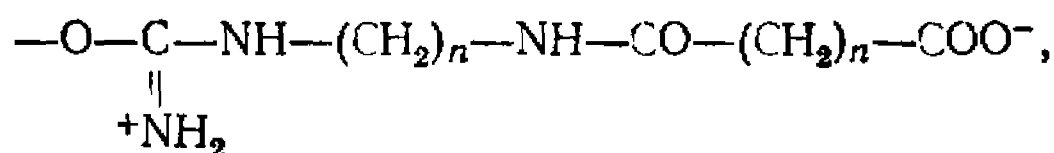


Рис. 4.31. Фосфорилированная по невосстанавливающему концу фосфоцеллюлоза, применяемая в качестве аффинного лиганда для глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и фосфоглюкозоизомеразы.

ли имеют дело с ферментами, связывающими фосфорилированные субстраты. Путем адсорбции на фосфоцеллюлозе обычно очищают ферменты, воздействующие на нуклеиновые кислоты. Несколько тРНК-синтетаз было успешно элюировано с фосфоцеллюлозы с помощью РНК-субстратов [61]. Глюкозо-6-фосфат — дегидрогеназа [63], гексокиназа [63] и глюкозофосфатизомераза [56] также могут связываться с фосфоцеллюлозой и специфически элюироваться с нее; в этих случаях можно предполагать, что специфическое действие проявляют фосфорилированные невосстанавливающие концы целлюлозы (рис. 4.31). Но в большинстве других случаев фосфоцеллюлозу следует рассматривать просто как ионообменник, поведение которого было описано в предыдущем разделе.

Йон [64, 65] ввела понятие «мультифункциональные адсорбенты», которые содержат как положительные, так и отрицательные гидрофобные группы, ковалентно-соединенные с агарозой:



где $n=8$ или 10.

Первоначально эти группы служили удлиняющими мостиками для аффинных адсорбентов, однако затем было установлено, что они обладают «неспецифическими» адсорбционными свойствами благодаря своей мультифункциональной природе. Биоспецифическая элюция с этих адсорбентов, называемых «имфилитами», в ряде случаев оказалась успешной [66, 67]. Интерпретация адсорбции и элюции при использовании имфилитов намного сложнее, чем в случае ионообменников, так как здесь совсем неизвестна подлинная природа связывания белка. Будучи потенциально полезными, эти адсорбенты были в значительной степени вытеснены окрашенными (т. е. связанными с красителями) адсорбентами, которые функционируют также за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий (разд. 3.6). Главную проблему представляет низкая адсорб-

ционная емкость имфилитов; на 1 см^3 адсорбента рекомендуется использовать всего 100 мкг белка [65].

Порат [68, 69] ввел в употребление диполярные ионообменники (см. также разд. 4.8), обладающие высокими адсорбционными емкостями, но по своему поведению несколько отличающиеся от ионообменников. Они содержат как положительно, так и отрицательно заряженные группы. Изучение этих адсорбентов с целью их использования для аффинной элюции, по-видимому, будет оправдано.

4.5. АФФИННАЯ АДСОРБЦИОННАЯ ХРОМАТОГРАФИЯ

Чтобы не путать с предыдущим разделом, этот раздел, в котором описано то, что обычно понимается под названием «аффинная хроматография», озаглавлен «Аффинная адсорбционная хроматография». В этом случае биоспецифический отбор происходит на стадии адсорбции, так как выделяемый белок обладает специфическим сродством к адсорбенту благодаря его способности связывать лиганд (рис. 4.32). Нет четкого разделения между действительно специфическими аффинными адсорбентами, которые кроме белков, имеющих центры связывания для иммобилизованного лиганда, связывают мало других белков, и адсорбентами общего типа, которые хотя и проявляют специфичность к определенным классам белков, связывают также и многие другие. Описание адсорбентов второго типа можно начать с окрашенных адсорбентов, обладающих значительной избирательностью к ферментам, имеющим нуклеотидсвязывающие центры, а затем перейти к таким адсорбентам, как фосфоцеллюлоза, которая, будучи в основном ионообменником, часто используется в качестве псевдоаффинного носителя для белков, связывающих нуклеиновые кислоты [70], и ферментов, взаимодействующих с фосфорилированными сахарами [62, 63]. Хотя

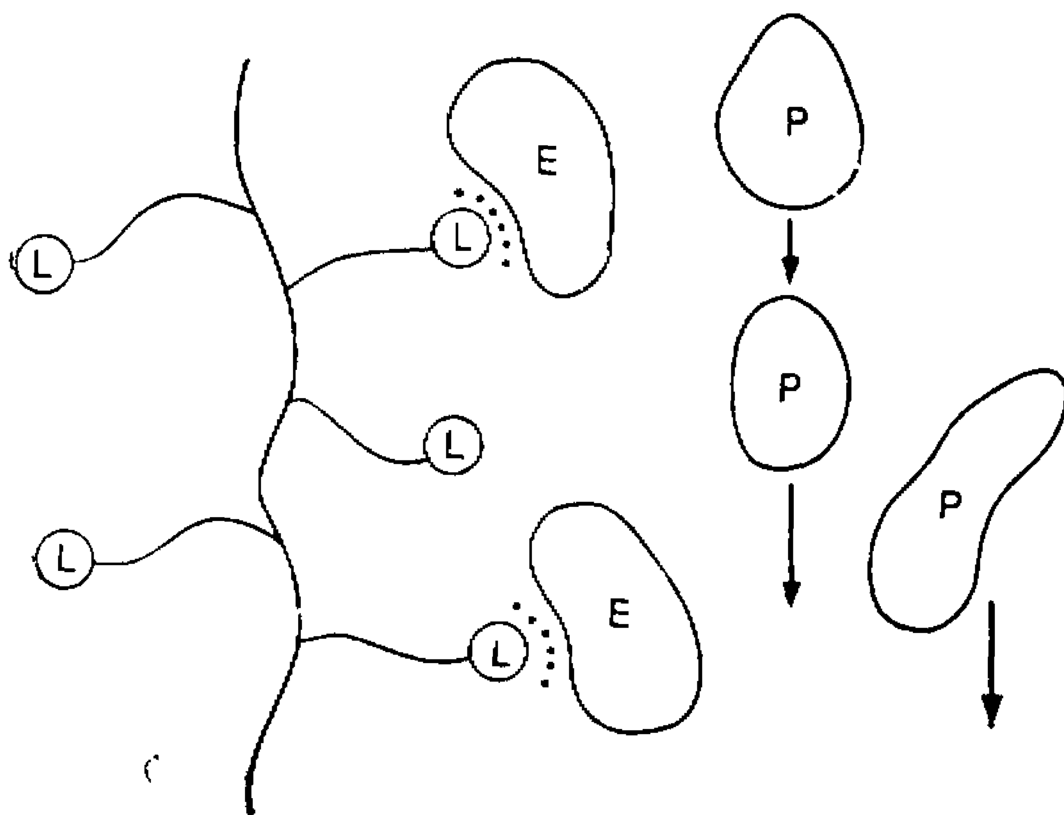


Рис. 4.32. Основной принцип аффинной адсорбционной хроматографии. Лиганд L ковалентно присоединен к цепи носителя. Адсорбент связывает только молекулы фермента E, обладающего специфическим сродством к L. Белки P проходят через колонку, не связываясь с адсорбентом.

и существуют некоторые готовые нерастворимые материалы, имитирующие субстрат или являющиеся настоящими субстратами, например крахмал (для амилаз — ферментов, участвующих в метаболизме гликогена), целлюлоза (для целлюлаз) и фосфоцеллюлоза (см. выше), во всех остальных случаях аффинные адсорбенты необходимо синтезировать, ковалентно соединяя лиганд с подходящим носителем. При выборе носителя руководствуются теми же соображениями, что и при использовании его в качестве ионообменника — а именно носитель должен быть пористым гидрофильным полимером, который можно производить в виде частиц нужного размера, что обеспечивает свободный доступ макромолекул к соединенному с носителем лиганду и адекватный поток буфера в наполненной этим носителем колонке. При работе с глобулярными белками очень широко используются сферические гранулы агарозы, имеющие предел исключения, равный примерно 10^7 дальтон; однако применяются и другие адсорбенты, которые в ряде случаев могут обладать теми или иными преимуществами. В настоящее время все большее распространение получают поперечно-сшитые гранулы агарозы, так как они не разрушаются и сохраняют свои размеры как под давлением, так и при смене буфера или растворителя. Обычно применяются сефароза-4В и сефароза CL6B (Pharmacia), а также агарозы фирмы Bio-Rad. Здесь мы только кратко коснемся методов присоединения лиганда к матрице; более полно этот вопрос освещен в последних публикациях, посвященных исключительно технике аффинной адсорбции [71—73]. Ниже перечислены основные требования к аффинной адсорбции.

1. Лиганд должен быть присоединен к матрице таким образом, чтобы при связывании его с белком не возникало серьезных затруднений.

2. Удлиняющий мостик между матрицей и лигандом должен облегчать доступ белка к лиганду (или служить другим целям — см. ниже).

3. Неспецифическое взаимодействие не должно быть слишком сильным, чтобы, за исключением нужного белка, все остальные белки не могли связываться с адсорбентом.

4. Связь лиганда с матрицей должна быть стабильна в условиях проведения хроматографии, в том числе в процессе «очистки» адсорбента перед его повторным использованием.

Синтез аффинных адсорбентов

В основе любого метода синтеза аффинных адсорбентов лежит один из двух общих приемов: лиганд (или его аналог) присоединяют к адсорбенту, уже имеющему удлиняющий мостик,

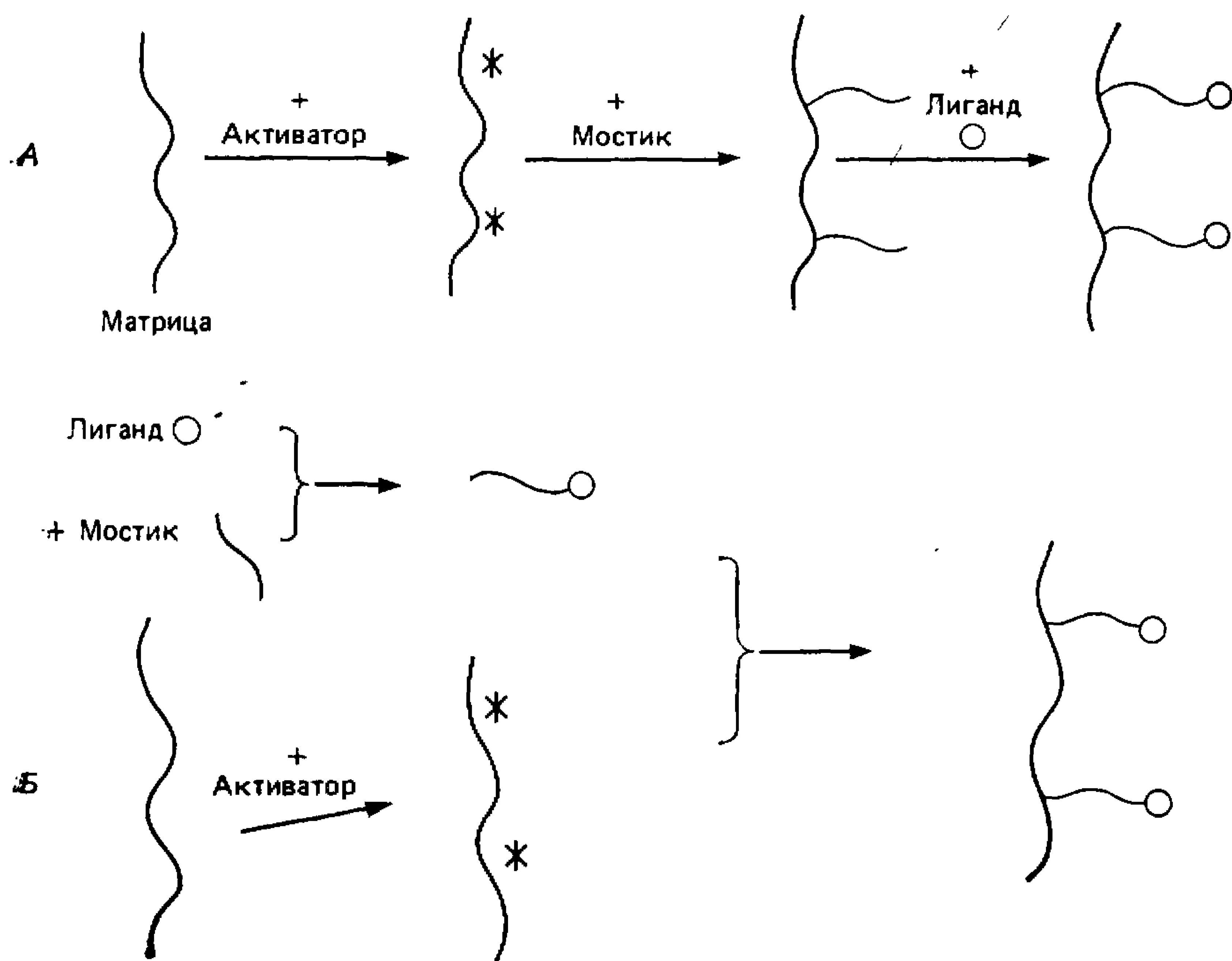


Рис. 4.33. Альтернативные подходы к синтезу аффинного адсорбента. *А*. Удлиняющий «мостик» присоединяется к матрице, а затем с ним ковалентно связывается лиганд. *Б*. Удлиняющий «мостик» сначала присоединяется к лиганду, а затем лиганд с «мостиком» связывается с матрицей.

либо аналог лиганда, содержащий удлиняющий мостик, присоединяют к активированному адсорбенту (рис. 4.33). Удлиняющий мостик должен иметь реакционноспособные концевые группы, способные присоединяться к носителю и к лиганду. В некоторых случаях соединение лиганд — удлиняющий мостик синтезируют из компонентов меньшего размера и не в один этап. Примером может служить N^6-аминогексил-АМР [74].

С химической точки зрения процесс активации носителя представляет собой реакцию с участием гидроксильных групп агарозной матрицы; чаще всего используют реакцию с бромцианом. Первоначальная методика [75] была заменена более простой, в которой вся реакция завершается за несколько минут [76]. Широко применяется имеющаяся в продаже активированная бромцианом агароза. Реакция с бромцианом достаточно сложная: как показано на рис. 4.34, образуются циклические (I) и ациклические (II) имидокарбонаты, а в качестве побочных продуктов — некоторое количество карбаматов (III)

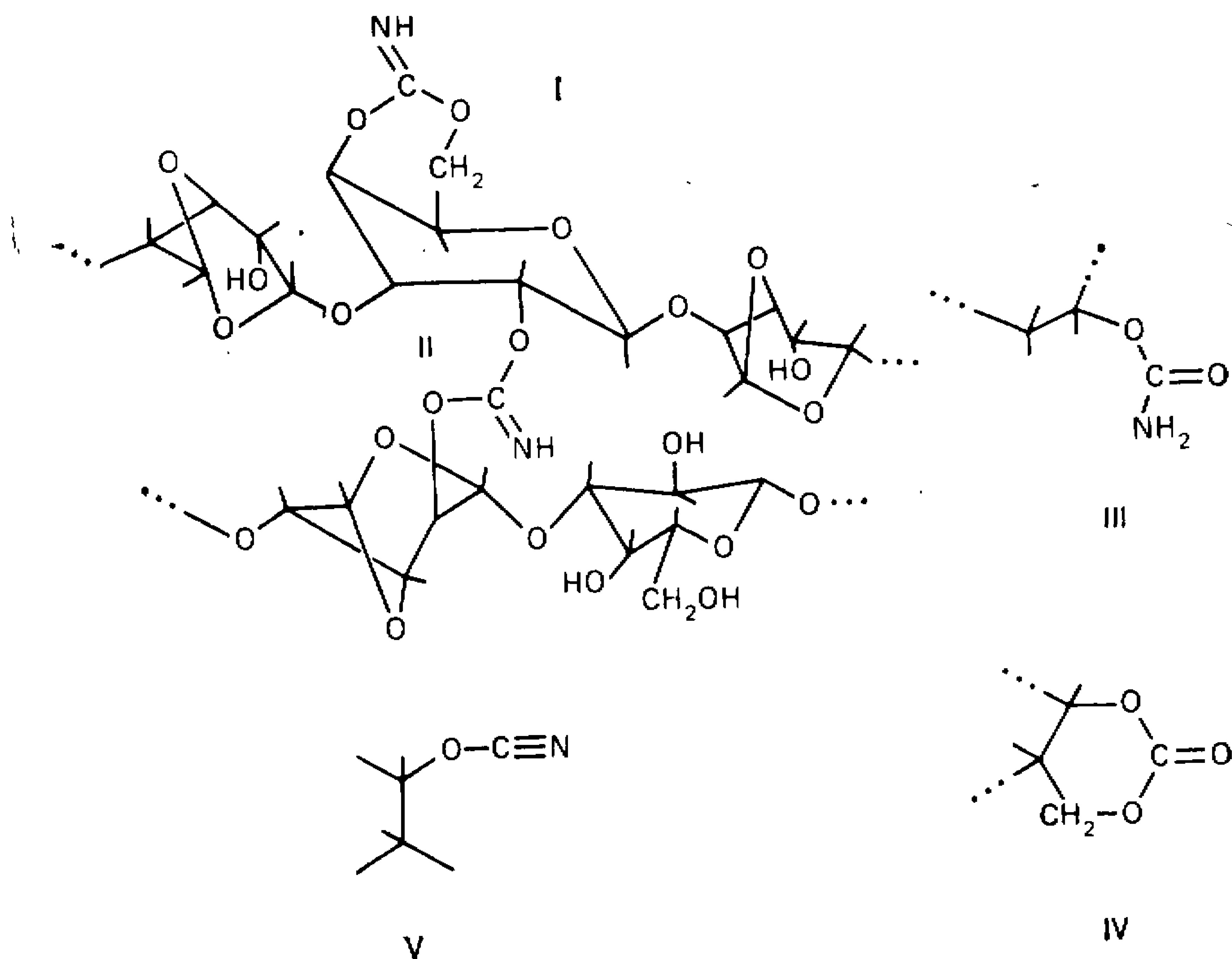


Рис. 4.34. Продукты реакции бромциана с агарозой. I — циклический имидокарбонат, II — ациклический имидокарбонат, III — карбамат, IV — карбонат, V — цианат.

и карбонатов (IV), но основным реакционноспособным компонентом является цианат (V) [77]. В препаратах сефарозы, активированной бромцианом (фирма Pharmacia), нестойкие в кислой среде имидокарбонаты разрушают, обрабатывая эти препараты кислотой.

В слабощелочной среде (pH 9—10) активированная агароза быстро взаимодействует с первичными аминами с образованием главным образом производного изомочевины (рис. 4.35). В ре-

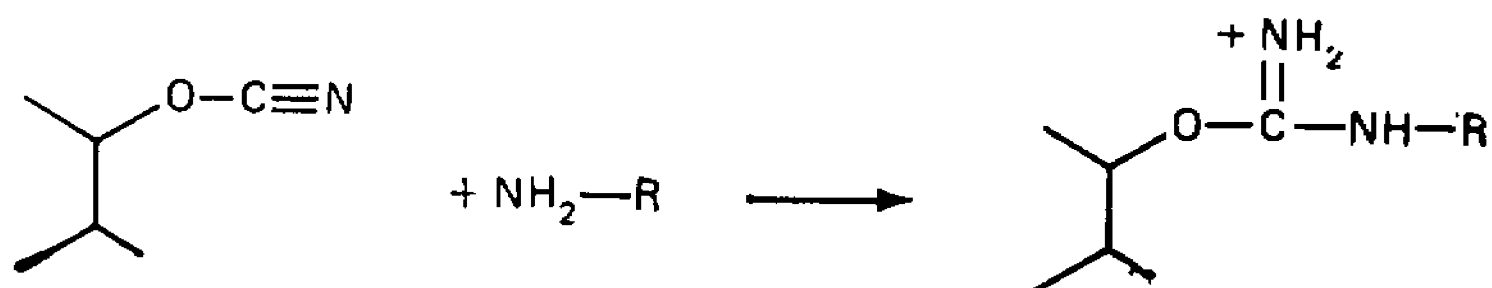


Рис. 4.35. Взаимодействие цианата (рис. 4.34, V) с аминосоединением, в результате которого образуются производные изомочевины.

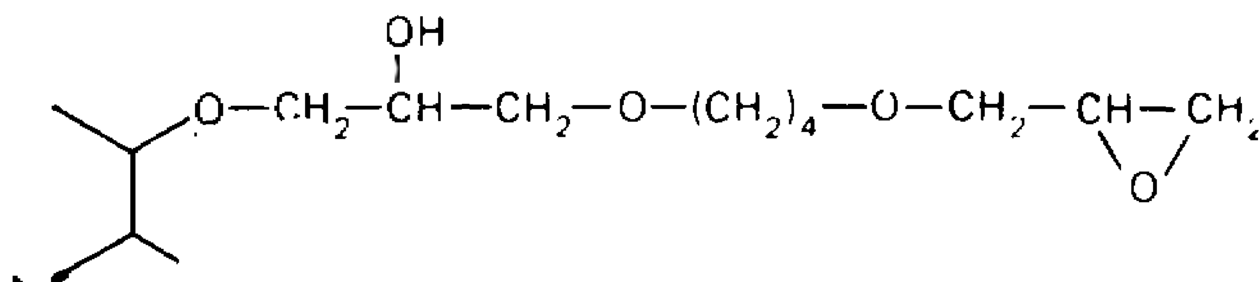


Рис. 4.36. Агароза, активированная бисоксираном (эпоксиактивирование).

зультате одновременно идущего гидролиза образуются карбаматы (III) и карбонаты (IV), показанные на рис. 4.34.

При нейтральных значениях pH это производное изомочевины заряжено положительно, что влияет на поведение аффинных адсорбентов, придавая им характер анионообменников. С другой стороны, многие присоединенные лиганды несут отрицательный заряд, поэтому производное изомочевины может нейтрализовать возможные катионообменные эффекты, сохранив при этом биполярный ионный характер [69].

Хотя активация агарозы бромцианом до сих пор остается наиболее широко применяемым методом, особенно при ее использовании для присоединения белков через ε-лизиновые группы (см. разд. 4.7), в настоящее время разработаны и другие, более совершенные и эффективные методы, которые, безусловно, с успехом заменят активацию бромцианом. Первый метод — это «эпоксиактивация», при которой в агарозу вводят эпоксидную группу, используя в качестве ее источника диглицидный эфир 1,4-бутандиола (бисоксиран) (рис. 4.36) [78].

В последнем случае одновременно происходит и введение удлиняющего мостика, так как между носителем и реакционноспособной эпоксидной группой находится 11 атомов. Эпоксидные группы несколько более реакционноспособны, чем цианаты; они не только вступают в реакцию с первичными аминами, но и взаимодействуют с гидроксильными группами, образуя соединения с простыми эфирными связями (рис. 4.37). Реакцию проводят при pH 8,5—11; взаимодействие с гидроксильными группами идет медленно и завершается через 24 ч при комнатной температуре.

Третий метод состоит в активации агарозы 1,1′-карбонилдиимидазолом. Образующийся при этом продукт так же реакционноспособен, как и цианат; при его взаимодействии с первичным амином положительный заряд не сохраняется, а образуется уретановая связь (рис. 4.38). Этот реагент менее ядовит, чем бромциан или бисоксираны.

Самый современный и, возможно, самый лучший метод — это использование толуолсульфонилхлорида (тозилхлорида) [80] или более реакционноспособного 3,3,3-трифторэтансульфонилхлорида (трезилхлорида) [81]. Активация агарозы путем

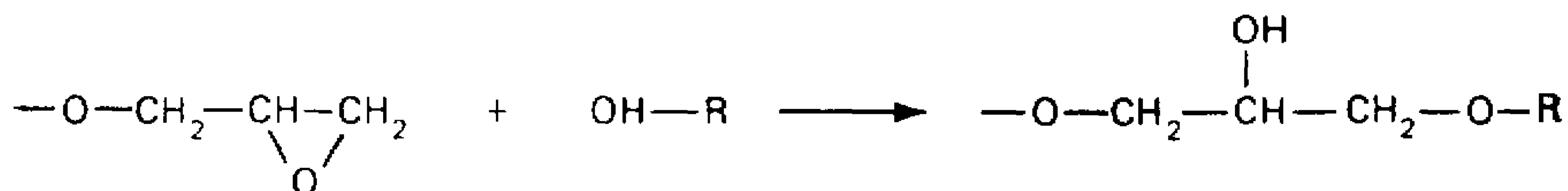


Рис. 4.37. Взаимодействие эпоксиактивированной агарозы с гидроксильной группой.

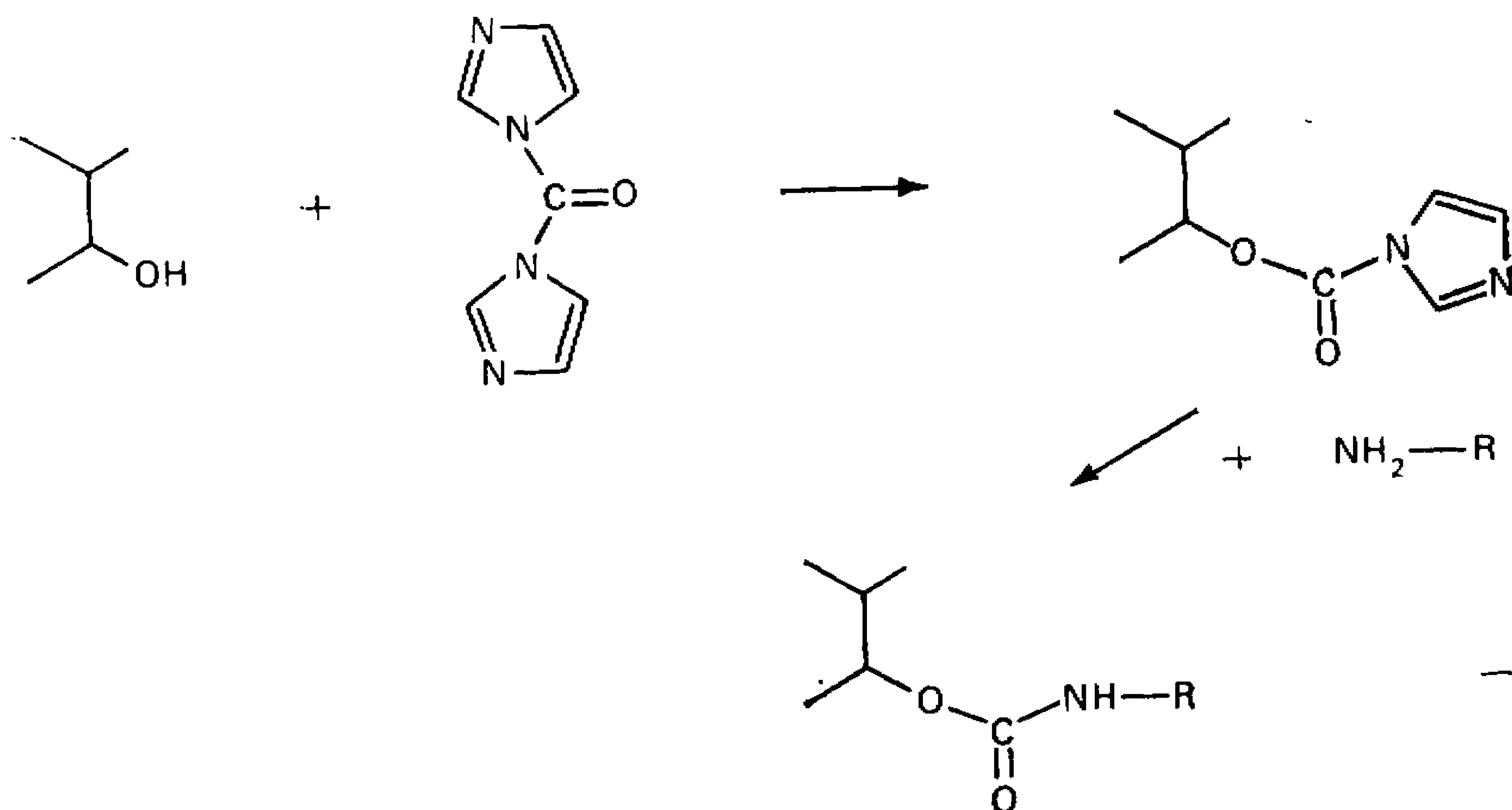


Рис. 4.38. Активация агарозы карбонилдиимидазолом и реакция активированного носителя с амином.

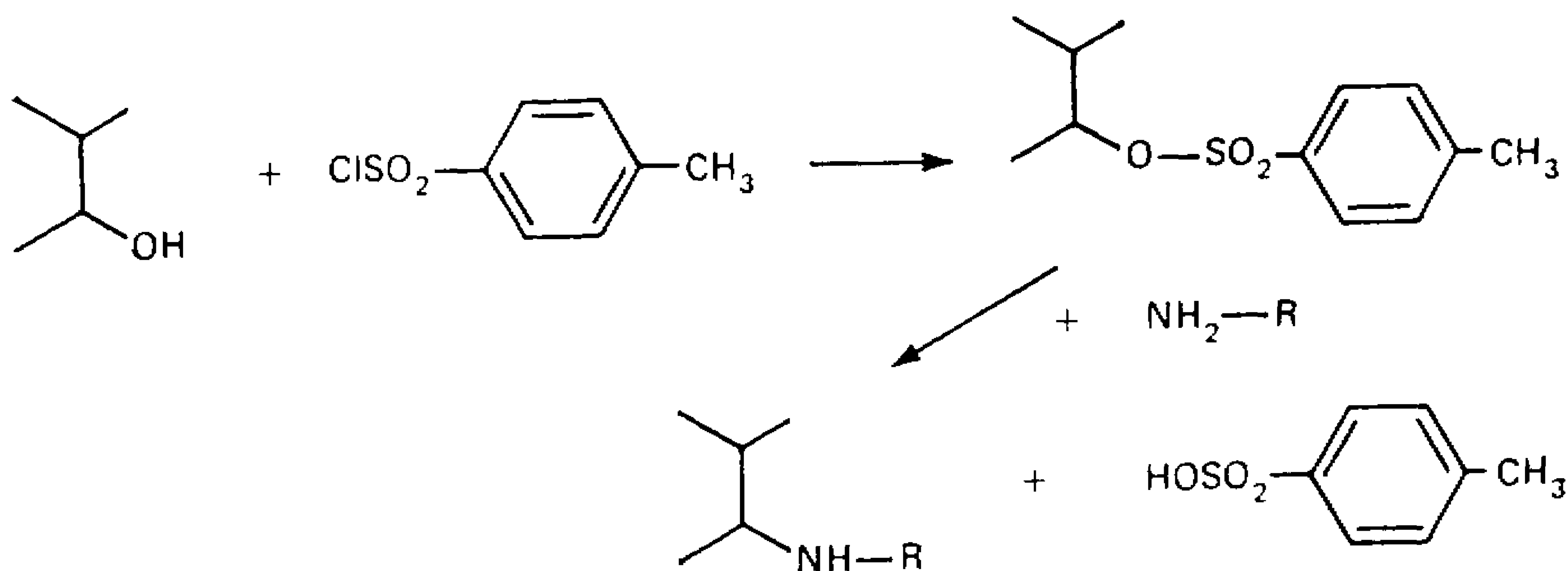
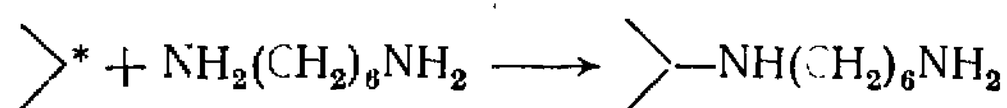


Рис. 4.39. Получение тозилактивированиой агарозы и ее реакция с амином.

введения в нее тозильной группы протекает легко и быстро; при этом из первичного амина лиганда образуется очень стойкий вторичный амин (рис. 4.39). При нейтральных значениях pH вторичная аминная группа заряжена, поэтому поведение адсорбента очень напоминает его поведение при активации бромцианом, но в этом случае образуется намного более стабильная связь.

На практике в приведенных выше примерах RNH_2 представляет собой либо лиганд с удлиняющим мостиком, содержащим на конце заранее введенную аминогруппу, либо гексаметилендиамин, образующий мостик, оканчивающийся другой первичной аминогруппой:



$$>^{*} + NH_2(CH_2)_6NH_2 \longrightarrow >\!-NH(CH_2)_6NH_2$$

Подробное описание химических процессов, происходящих при соединении лигандов и мостиков того или иного типа, выходит за рамки данного раздела; эти процессы подробно рассматриваются в других публикациях.

В настоящее время производится много различных носителей, используемых в качестве аффинных адсорбентов, причем они могут быть либо в «активированной» форме, либо связаны с удлиняющим мостиком, либо полностью готовы к работе. Готовые адсорбенты в большинстве случаев содержат общие лиганды, которые не обладают специфичностью по отношению к какому-то одному ферменту, а способны связываться с различными белками. В частности, были широко исследованы нуклеотидные лиганды, так как многие ферменты используют нуклеотиды как кофакторы или субстраты. Таким образом, хотя специфичность этих адсорбентов далека от абсолютной, они обычно дают хорошие результаты и применяются при работе с разными ферментами. Установлено, что 31% всех известных ферментов использует один из четырех нуклеотидных кофакторов [82]. Если к ним присоединить ферменты, для которых нуклеиновые кислоты служат в качестве субстратов, а также ферменты, для которых нуклеотиды играют роль активаторов или ингибиторов, то общее их число превысит 50%. Это не обязательно означает, во-первых, что 50% белка в данном экстракте составляют именно эти ферменты и, во-вторых, что многие из них будут непременно связываться с данным нуклеотидным аффинным адсорбентом в используемых условиях. Список имеющихся в продаже адсорбентов на 1978 г. представлен в работе [72]; более полные списки приводятся в каталогах основных фирм (P-L Biochemical, Sigma, Pharmacia, Bio-Rad).

Приложение теории хроматографии к аффинной адсорбции

Теорию, изложенную в разд. 4.1, можно применить к адсорбционной хроматографии и сделать при этом некоторые интересные выводы. Поскольку константа диссоциации комплекса адсорбента с белком (K_P) должна быть близка к константе диссоциации комплекса белка с лигандом или каким-то образом связана с ней, можно легко рассчитать величину коэффициента распределения. Один из недостатков аффинных адсорбентов заключается в том, что, хотя степень модификации может быть достаточно высокой (1—10 мкмоль·см$^{-3}$), только незначительная часть иммобилизованного лиганда оказывается ориентированной должным образом даже при наличии удлиняющего мостика; обычно только 1—2% общего числа центров связывают белок. Хорошей считается емкость в 1—2 мг·см$^{-3}$, что для белка с мол. массой 100 000 соответствует величине m_t от 0,01 до 0,02 мМ. Если допустить, что m_t равно 0,02, а p_t — 0,01 в уравнении (4.5), то можно вычислить величины α для различных значений K_P, данных в табл. 4.7.

Несколько неожиданным результатом является то, что для хорошей адсорбции ($\alpha>0,9$) величина K_P должна быть ниже 0,001 мМ или 10^{-6} М, т. е. меньше, чем обычные константы диссоциации для комплексов белок—лиганд. Если учесть, что специфическое взаимодействие белка с иммобилизованным в колонке лигандом, вероятно, слабее, чем его взаимодействие со свободным лигандом, то естественно возникает вопрос, каким же образом осуществляется аффинная адсорбционная хроматография.

Ответ на этот вопрос был найден в процессе поисков удовлетворительных методов присоединения лигандов к носителю. Непосредственное их присоединение к матрице редко оказывалось успешным, однако использование удлиняющего мостика, состоящего обычно из шести метиленовых групп, улучшало адсорбцию. Тем не менее оставалась проблема неспецифических

Таблица 4.7. Значения α при m_t=0,02 мМ и p_t=0,01 мМ

K_P, мМ	α	K_P, мМ	α
1,0	0,02	0,003	0,80
0,3	0,06	0,001	0,92
0,1	0,16	0,0003	0,97
0,03	0,35	0,0001	0,99
0,01	0,59		

гидрофобных взаимодействий с гексаметиленовой цепью, приводящих к адсорбции посторонних белков на мостике. Поскольку адсорбция происходит за счет гидрофобных взаимодействий, введение в мостик гидрофильных групп (карбонильных и амидных) должно уменьшать степень связывания и делать адсорбент более специфичным по отношению к белку, для которого он предназначен. К сожалению, эти химически сложные адсорбенты часто очень слабо взаимодействуют с нужным ферментом и вообще с любыми другими соединениями [83, 84]. Как оказалось, гидрофобные взаимодействия являются необходимым условием связывания белка с адсорбентом. На самом деле первоначальные попытки получить аффинные адсорбенты без удлиняющих мостиков были безуспешными, вероятно, не потому, что близость лиганда к агарозному остову приводила к стерическим затруднениям, а потому, что нужны были дополнительные силы связывания, которые обеспечиваются гидрофобной вставкой. Некоторые термодинамические расчеты дают представление о силе необходимых дополнительных взаимодействий.

Энергия взаимодействия выражается как $\Delta G^0 = -RT\ln K_P$, и можно предположить, что она состоит из специфического взаимодействия фермента с лигандом ΔG^0_L и неспецифического взаимодействия ΔG^0_N.

Если K_P составляет 0,001 мМ, то $\Delta G^0 = \Delta G^0_L + \Delta G^0_N = 34{,}5$ кДж×моль$^{-1}$.

Если K_L, специфическая константа диссоциации, составляет 0,1 мМ, то $\Delta G^0_L = 23$ кДж·моль$^{-1}$ и $\Delta G^0 = 11{,}5$ кДж·моль$^{-1}$.

Допустив, что $m_t = 0{,}02$ мМ и $p_t = 0{,}01$ мМ, можно вычислить величину α: она будет равна 0,92.

Предположим, что введение свободного лиганда полностью исключает биоспецифическое взаимодействие белка с матрицей и ΔG^0_L равняется 0. Тогда величина α должна уменьшаться с 0,92 до 0 (так как ΔG^0_N, равная 11,5, — слишком незначительная величина, чтобы при этом могло происходить какое-либо заметное удерживание белка на колонке).

Представив различные параметры в виде таблицы, получим:

K_P, мМ	K_L, мМ	α при отсутствии свободного лиганда	α в присутствии свободного лиганда
0,001	0,1	0,92	0
0,001	1,0	0,92	0,02
0,001	10	0,92	0,16
0,0001	0,1	0,99	0,02
0,0001	1,0	0,99	0,16
0,0001	10	0,99	0,59

Из этих данных видно, что, поскольку неспецифические силы довольно слабы, величина K_P может быть очень низкой, даже если K_L имеет величину 10^{-3} и выше. Например, АМР, при-

соединенный к агарозе, прочно связывает дегидрогеназы, хотя величина K_i этих ферментов для AMP обычно лежит в пределах 1—10 мM; неспецифические взаимодействия приблизительно той же силы обеспечивают прочное связывание фермента. Так как специфические и неспецифические силы аддитивны, константы диссоциации перемножаются. Устранение или снижение специфического связывания при введении свободного лиганда вызывает повышение величины K_P до значений, достаточных для быстрой элюции. Но если величина K_L высока, то концентрация лиганда, необходимого для эффективного замещения фермента, должна быть еще выше.

Подходящий аффинный адсорбент для гексокиназ можно получить, присоединив глюкозамин к агарозе через алкильную цепь [85]. Было установлено, что величины K_i для N-аминоацилглюкозаминов (в свободном растворе) имеют более высокие значения, чем для самого глюкозамина, при наличии в аминоацильной цепи шести или меньшего числа атомов С, что указывает на нарушение связывания за счет ацильной цепи; однако, когда в цепи имеется восемь атомов С, величина K_i становится намного ниже, т. е. происходит какое-то взаимодействие ацильной цепи с ферментом. Хотя гексокиназа дрожжей не связывается с агарозо-$(CH_2)_6$-ацилглюкозамином, она удерживается на колонке с агарозо-$(CH_2)_8$-ацилглюкозамином и может быть элюирована с нее глюкозой. Для связывания фермента с этим адсорбентом необходимо неспецифическое взаимодействие. Изоферменты гексокиназы млекопитающих избирательно связываются с такими адсорбентами; хроматографию ферментов типов II и III можно провести на адсорбенте, имеющем в качестве удлиняющего мостика фрагмент C_6, тогда как для удерживания почечного изофермента типа I необходим фрагмент C_8.

Вычисления, проведенные выше, а также данные табл. 4.7 основаны на двух допущениях, которые могут не подтвердиться. Первое касается возможной гетерогенности распределения присоединенных лигандов; в ограниченных участках адсорбента величина m_t может быть намного выше, поэтому даже при низких значениях констант связывания (например, $K_P \simeq 10^{-4}$ M) с адсорбентом может связаться гораздо больше белка, чем можно было бы предположить. В одном из недавних исследований для анализа распределения лигандов использовали модельные спин-меченые лиганды [86]. Оказалось, что негомогенность в их распределении незначительна. Однако было обнаружено (путем подсчета на основе степени модификации), что при близком расположении лигандов друг от друга белок среднего размера может связываться с ними одновременно в нескольких участках (если белок имеет более одного центра связывания).

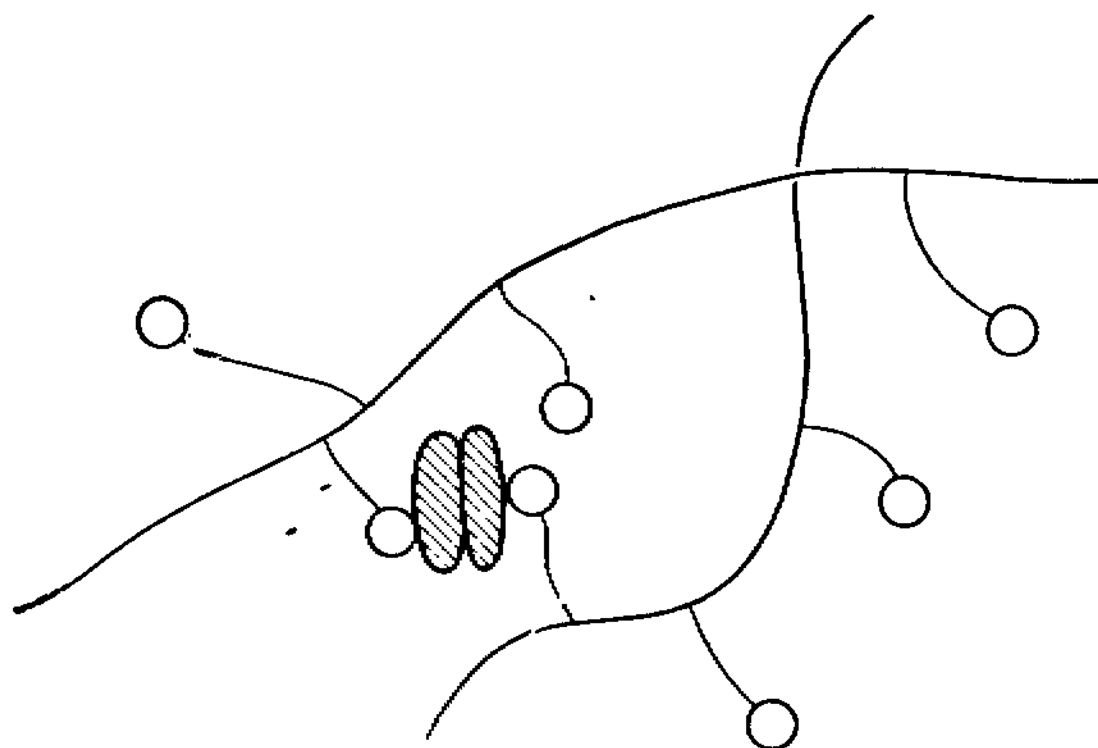


Рис. 4.40. Схема, иллюстрирующая необходимость точного пространственного расположения димерного фермента (заштрихован) на аффинном адсорбенте для специфического присоединения к нему лиганда в двух точках.

Отсюда вытекает второе допущение: соединение лиганда с одним центром связывания не всегда оказывается достаточным для получения хороших результатов и в некоторых случаях низкий процент связывания может быть обусловлен тем, что фермент должен быть расположен между близлежащими лигандами определенным образом, что обеспечивает его присоединение к последним по двум центрам связывания (рис. 4.40). Это, конечно, неприемлемо для моновалентных ферментов (один центр связывания).

В заключение следует отметить, что при аффинной адсорбционной хроматографии энергия взаимодействия между белком и носителем должна составлять по крайней мере 35 кДж·моль$^{-1}$, что редко наблюдается при единичном взаимодействии белок — лиганд. Половина (и даже более) этой величины иногда приходится на неспецифические взаимодействия, обусловленные гидрофобными силами между аминокислотными остатками на поверхности белковой молекулы и удлиняющим мостиком. В этом случае аффинная элюция должна давать хорошие результаты и вполне достаточно весьма слабых специфических взаимодействий. Низкий процент связывания белка аффинным адсорбентом в некоторых случаях можно объяснить необходимостью биоспецифичного взаимодействия в двух точках (рис. 4.40), но более вероятно, что это обусловлено необходимостью еще и неспецифического связывания (помимо биоспецифического). Если на взаимодействия обоих указанных типов налагаются строгие пространственные ограничения, то лишь относительно небольшое число молекул лиганда будет ориентировано надлежащим образом и сможет связаться белком (рис. 4.41).

Поскольку неспецифические взаимодействия неизбежны, интересно было бы поразмышлять о возможности намеренного их

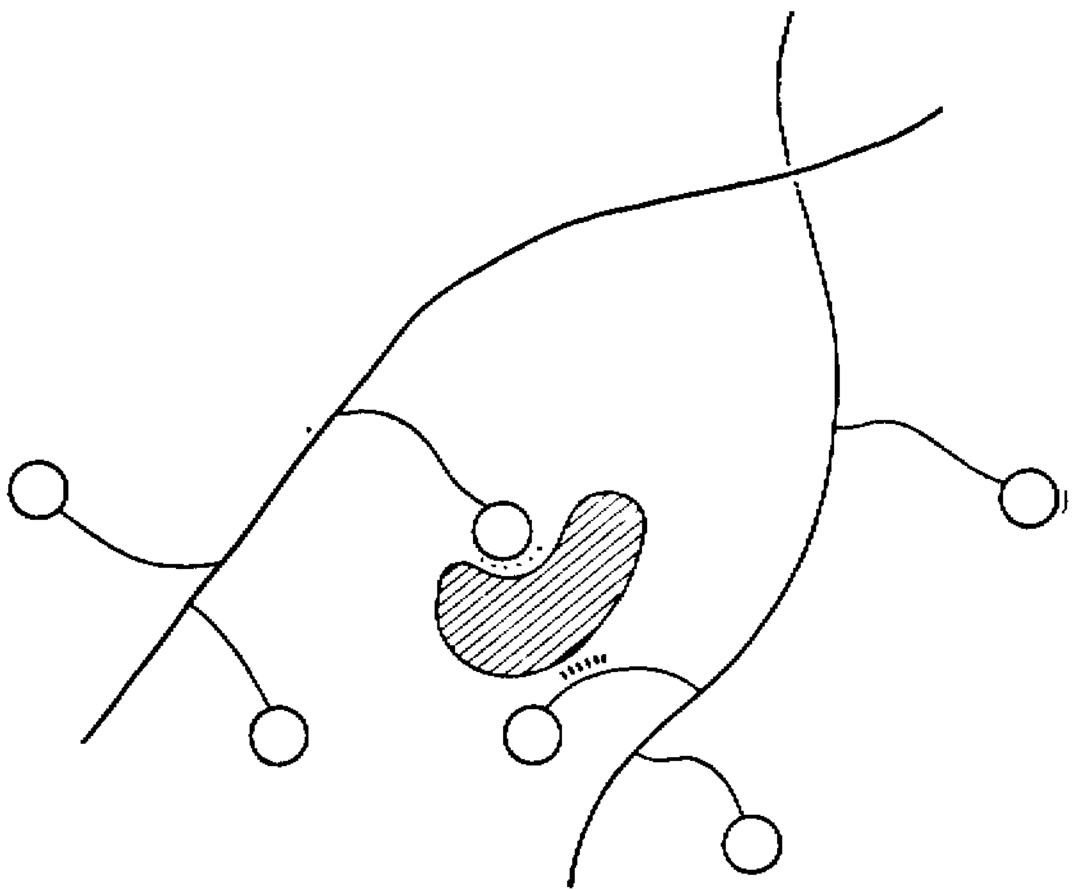


Рис. 4.41. Схема, иллюстрирующая необходимость точной пространственной ориентации фермента при специфическом и неспецифическом присоединении его к аффинному адсорбенту (фермент заштрихован).

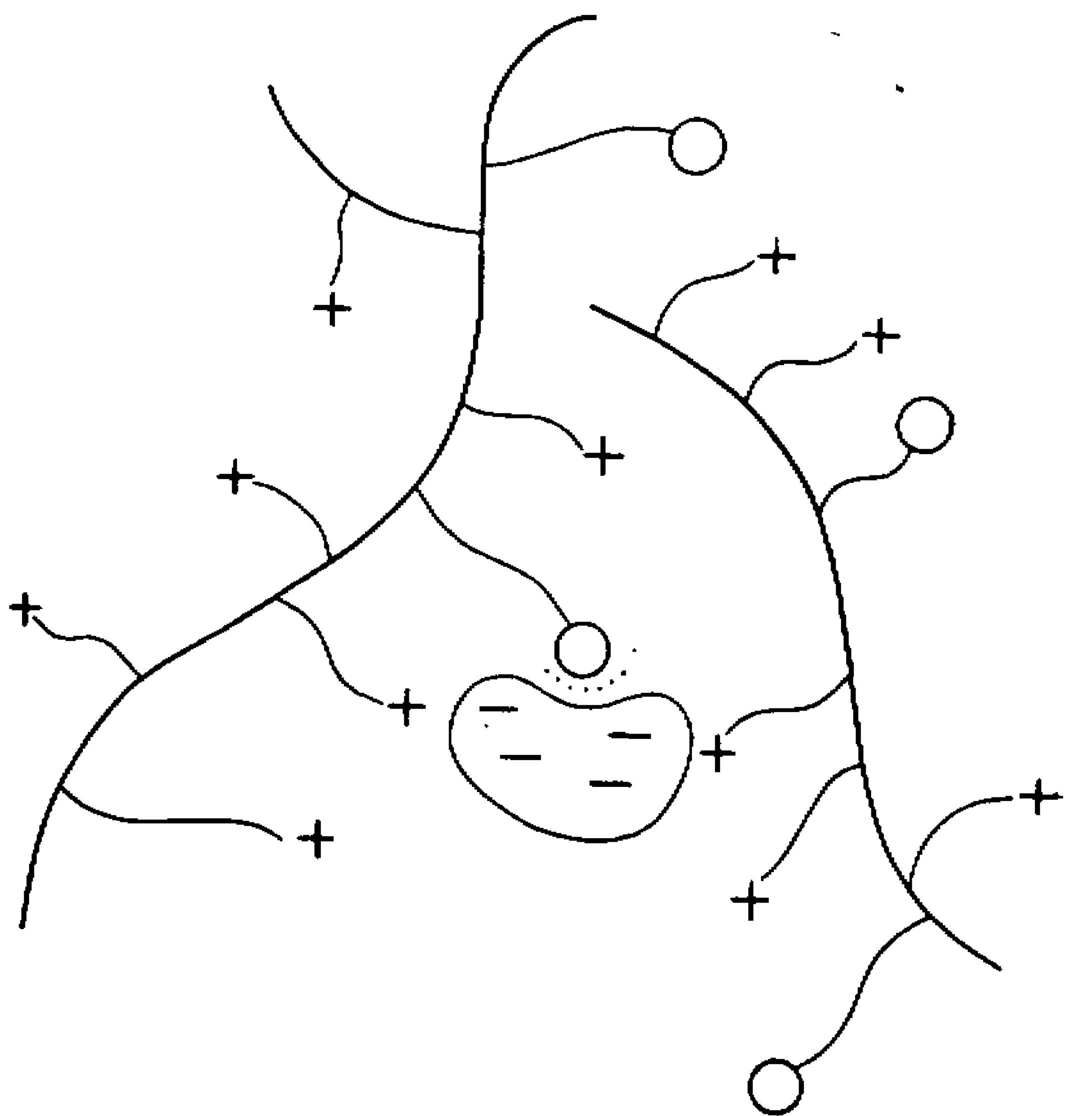


Рис. 4.42. Смешанная аффинная и ионообменная адсорбция отрицательно заряженных белков.

введения либо за счет использования более гидрофобного носителя, либо путем введения заместителей, имеющих высокую плотность заряженных групп, притягивающих противоположно заряженные молекулы белка, например ДЭАЭ (рис. 4.42). Адсорбент последнего типа мог бы работать в условиях, когда фермент практически не связывается с обычным ДЭАЭ ионообменником (α в пределах 0,1—0,4), но должен связываться со

смешанным адсорбентом, в котором ионообменные взаимодействия дополняют специфические, так что величина α становится равной 0,99 и выше. В этом случае аффинная элюция даст хорошие результаты, и емкость адсорбента по отношению к нужному ферменту будет высокой.

Методика должна быть следующей:

1) Исходный материал адсорбируют на ДЭАЭ-целлюлозе и элюируют с нее обычным методом ионообменной хроматографии.

2) Элюированную фракцию наносят, не меняя буфера, на аффинный ДЭАЭ-адсорбент — при этом специфически связывается только нужный фермент.

3) Фермент элюируют буфером, содержащим лиганд, или буфером с более высокой ионной силой и пониженным значением pH.

Такие гипотетические смешанные адсорбенты до сих пор не получены[1]. Следовательно, пока эта идея остается лишь предположением. Так как многие лиганды заряжены отрицательно, автоматически будет проявляться катионообменный эффект, и хотя предпочтительно работать с системой при таких значениях pH и ионной силы, которые позволяют избегать подобных эффектов, однако даже в идеальном случае это трудно достижимо. Например, киназа с незначительным сродством к AMP не связывается с AMP-агарозой в 0,1 M фосфатном буфере, но может связаться со смешанным катионообменником за счет отрицательного заряда AMP в более слабом буфере, таком, как 0,01 M МЭС или МОПС. Хотя при этом могут связываться и другие оснóвные ферментные белки, это не означает, что они будут вымываться при аффинной элюции с помощью свободного ATP, используемого для элюции киназы, если только концентрация ATP не будет значительно повышать ионную силу.

Общие методы и процедуры, применяемые при аффинной адсорбционной хроматографии

В начале 70-х годов, когда на многих примерах была доказана высокая эффективность аффинной хроматографии, химиками-энзимологами овладели чувства, которые можно выразить двумя фразами: «Как же мы не додумались до этого раньше?» и «Теперь все прочие методы выйдут из употребления». Позже общая эйфория прошла, после того как многие исследователи потратили месяцы, а то и годы, безуспешно пытаясь подобрать

[1] Фирма Bio-Rad недавно выпустила ионообменный адсорбент на основе голубой агарозы, работающий по этому принципу.

подходящий адсорбент для своего фермента. В некоторых случаях, особенно когда фермент имеет необычный субстрат и составляет только часть общего белка, присутствующего в смеси, не возникает вопроса о целесообразности применения этого метода, если найден соответствующий адсорбент. Описаны примеры одноэтапной 1000-кратной очистки ферментов почти со 100%-ным выходом. Простота и легкость осуществления этой процедуры создали возможность выделения большего числа важных ферментов, встречающихся в малых количествах. Но даже в сказке с хорошим концом бывает много тщетных усилий и хотя бы одна неудача. Основная проблема заключается в низкой емкости адсорбентов, хотя использование более новых методов связывания лигандов улучшает этот показатель и уменьшает неспецифическую адсорбцию (в результате специфическая емкость адсорбента по отношению к данному ферменту может снизиться еще больше). Однако, как мы видели, неспецифические взаимодействия являются неизбежным злом, если нужно адсорбировать определенный фермент; поэтому, чтобы добиться идеальных условий, необходимо методом проб и ошибок тщательно подбирать соответствующие адсорбент и буфер.

Чтобы создать адсорбент, следует прежде всего подумать о лигандах и возможных способах взаимодействия их с белком. Желательно, чтобы присоединение лиганда к носителю происходило в точке, не совпадающей с областью взаимодействия белка с лигандом; здесь могут быть полезны некоторые сведения об аналогах субстрата и величинах их K_i. Если можно выбирать между двумя лигандами, различающимися по размеру, следует выбрать более крупный, так как в этом случае существует больше различных способов присоединения его к носителю. Вероятность удачного присоединения небольшой молекулы, подобной аланину, незначительна, поскольку фермент, узнающий аланин, почти наверняка использует обе его заряженные группы и узнает метильную группу, отличающую его от других аминокислот. Таким образом, при использовании методов присоединения аланина, показанных на рис. 4.43, имеется мало шансов на то, что они *не* нарушают способности фермента узнавать эту молекулу. С другой стороны, адениновые нуклеотиды были успешно присоединены к агарозе в нескольких положениях (рис. 4.44).

Исходным материалом может служить обычная или предварительно активированная агароза (активация бромцианом, эпоксиактивация, а также введение карбонилдиимидазольных и тозильных групп) либо агароза, содержащая гексильную боковую цепь, оканчивающуюся карбоксильной группой или аминогруппой. Реакции с избытком лиганда или его аналога могут проходить в органических или водных растворителях — в зави-

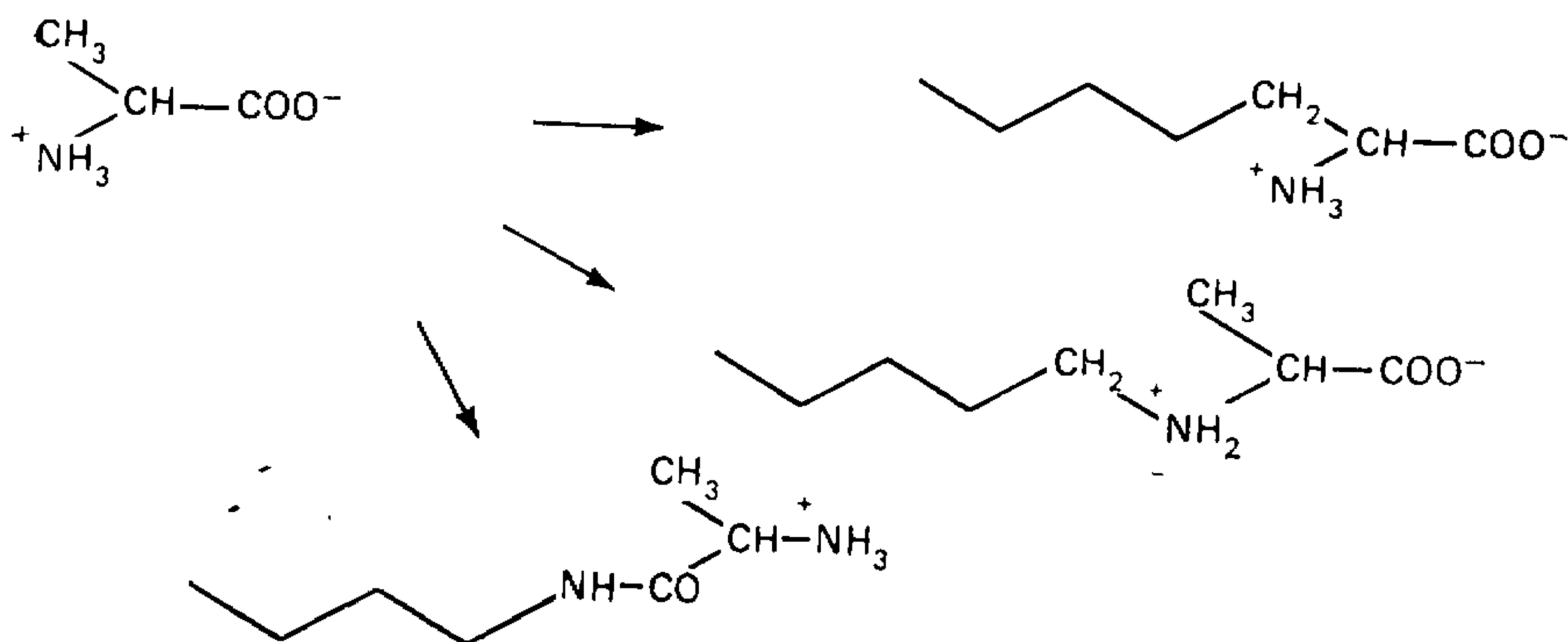


Рис. 4.43. Возможные способы иммобилизации аланина в качестве лиганда для аффинного адсорбента.

симости от химизма процесса. После завершения реакции определяют количество иммобилизованного лиганда.

Опыты по определению эффективности адсорбента обычно проводят в пастеровских пипетках; небольшой образец фермента, растворенный в подходящем буфере (не более 1 мл), наносят на адсорбент и колонку промывают. Если в этих условиях фермент остается на колонке, можно предположить, что α больше 0,9 и адсорбция идет быстро, поскольку скорость потока в пипетке, наполненной адсорбентом, выше оптимальной. Затем проводят опыты по элюции. Очень важен буфер, используемый вначале; как указывалось выше, устранение ионообменных эффектов может быть нежелательным (если только не слишком высоки биоспецифические взаимодействия), и можно попытаться работать при различной ионной силе, с разными буферами и солями. Существуют три основных метода элюции. Аффинная элюция буфером, содержащим лиганд, представляет собой идеальный, но в некоторых случаях слишком дорогостоящий метод. Часто используют весьма высокие концентрации лиганда, потому что между белком и адсорбентом в данном буфере возникает настолько сильное взаимодействие ($\alpha > 0,999$), что приходится повышать величину l (см. уравнение (4.9)). Если сначала изменить буфер так, чтобы величина α снизилась приблизительно до 0,9, то можно использовать более низкие концентрации лиганда, как это описано для аффинной элюции с ионообменников.

Для того чтобы снизить α перед проведением аффинной элюции, необходимо иметь представление о характере взаимодействий между белком и адсорбентом. Повышение концентрации соли значительно снижает биоспецифическое связывание белка,

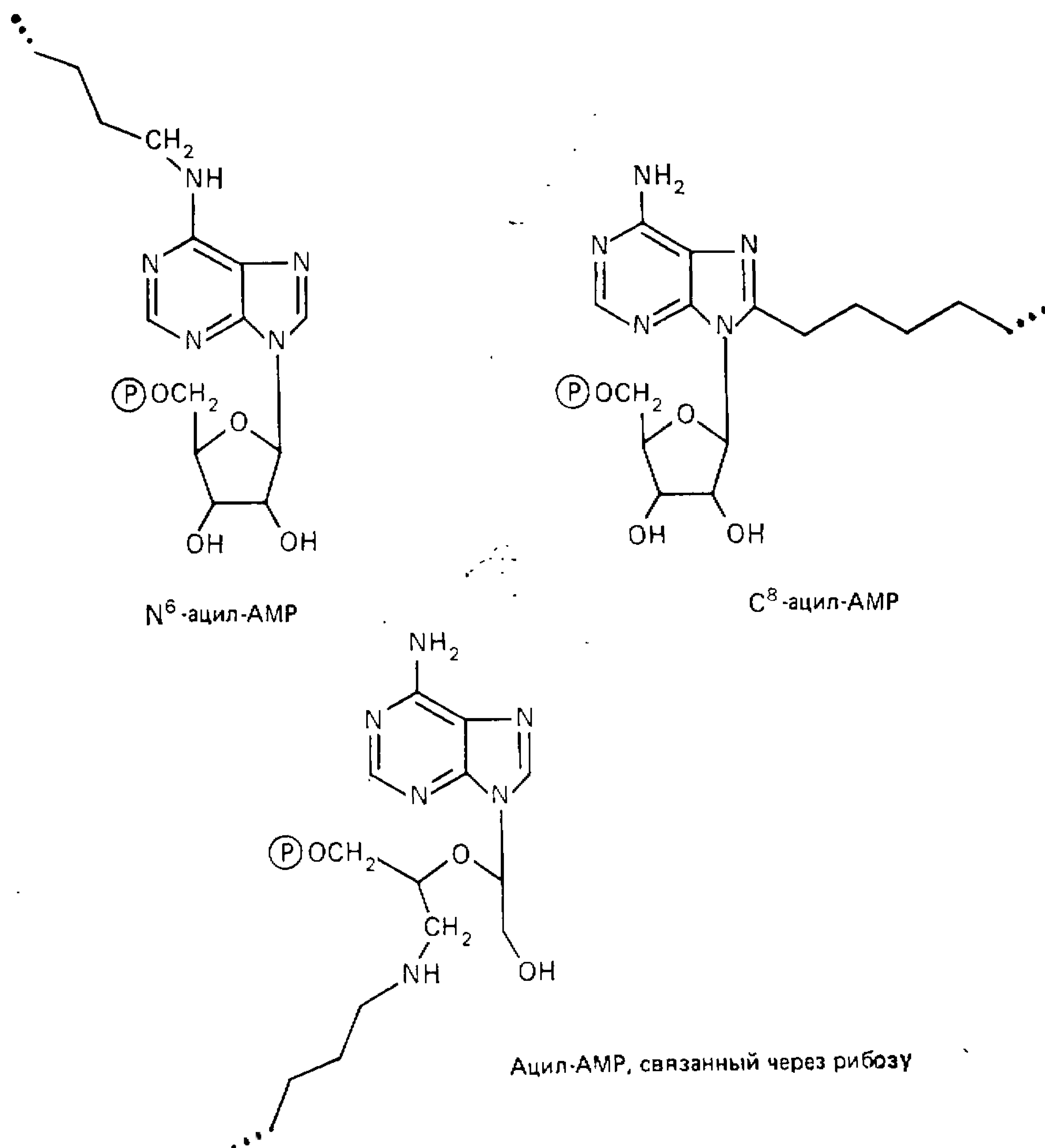


Рис. 4.44. Три способа присоединения AMP для получения аффинного адсорбента.

но может также привести к ослаблению взаимодействия белка со свободным лигандом при аффинной элюции (повышение величины K_L). Повышение концентрации соли ослабляет любые неспецифические ионные взаимодействия, но при этом усиливаются гидрофобные взаимодействия белка с адсорбентом, в особенности с удлиняющим мостиком. Если взаимодействия последнего типа важны, более эффективным может быть *снижение* концентрации соли. Кроме того, используют вещества, снижающие поверхностное натяжение (уменьшающие гидрофобные вандерваальсовы взаимодействия). Это может быть неионный

детергент, такой, как тритон X-100 в концентрации до 1% (по объему), этиленгликоль (10—50% по объему) или относительно небольшое количество этанола (до 5% по объему). При использовании заряженного лиганда этанол в указанной концентрации, скорее всего, не влияет на величину K_L. После предварительной промывки колонки этим буфером проводят аффинную элюцию с помощью лиганда, растворенного в том же буфере.

Второй метод заключается в применении высокой концентрации соли, вызывающей нарушение всех негидрофобных взаимодействий между иммобилизованным лигандом и белком, в том числе любых биоспецифических ионных или других полярных сил. Повышение концентрации соли приводит к возрастанию гидрофобных сил, и один из недостатков данного способа состоит в том, что при его использовании могут усилиться неспецифические взаимодействия. Тем не менее соль обычно вытесняет белок. Иногда происходит слишком сильное связывание и ни соль, ни свободный лиганд не способны вытеснить белок (это в особенности относится к иммуноадсорбентам, см. разд. 4.7). В таких случаях могут быть полезны хаотропные соли, например тиоцианат при высоких концентрациях. Иногда для этого лучше использовать низкие значения pH (но не слишком низкие, чтобы не денатурировать белок).

К другим методам элюции относятся изменение температуры (снижение температуры ослабляет гидрофобные взаимодействия), разведение буфера, даже промывка водой (разд. 4.7) и электрофорез для удаления заряженных белков с колонки [87]. В заключение следует сказать, что аффинная адсорбционная хроматография является великолепным методом, если вся процедура уже тщательно отработана, однако подбор или создание необходимых адсорбентов может быть очень трудоемким процессом.

Сейчас имеется в продаже много готовых адсорбентов, которые можно использовать для работы с самыми разными белками. Из-за низкой емкости и высокой стоимости этих адсорбентов метод чаще применяется для очистки белков, составляющих лишь незначительную часть всех белков, присутствующих в смеси. В этом случае он может быть использован в качестве первого (и иногда единственного) этапа очистки. С другой стороны, при работе с большими количествами фермента (например, 100 мг) чаще применяют другие методы, по крайней мере в качестве предварительных этапов в процессе фракционирования, а стадия аффинной адсорбции вводится только в конце для окончательной очистки препарата. Адсорбенты можно использовать многократно при условии, что после использования их немедленно промывают (например, растворами мочевины или додецилсульфата натрия) и хранят с добав-

ками бактерицидных агентов (азид, мертиолат, хлорбутол). Однако возникает проблема, связанная с потерей лиганда за счет нестойкости изомочевинной связи, образовавшейся при активации адсорбента бромцианом. Этого можно избежать, используя другие способы активации, приводящие к образованию более стабильной связи.

Ввиду того что существует много великолепных обзоров и монографий по аффинной хроматографии (см. в конце главы), я не останавливаюсь на этом вопросе более подробно и не перечисляю различные типы адсорбентов. Однако особый тип иммуноадсорбентов, в которых «лигандом» служит антитело к выделяемому белку, разбирается отдельно в разд. 4.7.

4.6. ХРОМАТОГРАФИЯ НА ОКРАШЕННЫХ АДСОРБЕНТАХ

Присоединив к высокомолекулярному растворимому декстрану краситель, известный под названием «цибакрон голубой F3GA», фирма Pharmacia Fine Chemicals получила окрашенный маркер свободного объема для проведения гель-фильтрации. Если бы был выбран другой краситель, то возможно, что окрашенные адсорбенты не получили бы такого широкого и быстрого распространения, какое наблюдается в настоящее время. Исследователи были озадачены, когда обнаружили, что при использовании декстрана голубого пируваткиназа дрожжей в процессе гель-фильтрации появляется в свободном объеме; это указывало на то, что ее молекулярная масса намного выше ожидаемой. Однако в отсутствие этого маркера фермент элюировался после свободного объема [88]. При гель-фильтрации пируваткиназы сначала без маркера, а затем в его присутствии достигалась определенная степень очистки фермента, несмотря на то что маркер в конечном счете необходимо было удалять. Пируваткиназа связывалась с голубым красителем. Присоединением декстрана голубого к агарозе стандартными методами, используемыми в аффинной хроматографии, был получен новый тип адсорбента. Аналогичное поведение было замечено практически одновременно и при работе с фосфофруктокиназой из дрожжей [89]. В дальнейшем выяснилось, что и другие ферменты, особенно дегидрогеназы, обладают сродством к этому красителю, и теперь принято считать, что большинство ферментов, связывающих пуриновые нуклеотиды, проявляют сродство к цибакрону голубому F3GA. Хотя многие другие родственные красители также связываются различными ферментами, до настоящего времени в большинстве случаев используют краситель цибакрон голубой F3GA.

Специфичность адсорбентов, связанных с красителем, такова, что их можно считать аффинными адсорбентами, хотя ис-

пользуемый краситель имеет мало явного сходства с истинным лигандом. Пожалуй, лучше называть их «псевдоаффинные адсорбенты». Молекулярные модели, показанные на рис. 4.45, дают представление о некотором сходстве между структурами красителя F3GA и NAD; более важно в данном случае соответствие между структурами плоских циклов и расположением отрицательно заряженных групп. Недавно рентгеноструктурные исследования показали, что краситель присоединяется к алкогольдегидрогеназе из печени в участке связывания NAD; при этом в структуре красителя выявляется соответствие с кольцами аденина и рибозы, но не с никотинамидом [91]. Таким образом, краситель ведет себя как аналог ADP-рибозы и присоединяется к участкам связывания AMP, IMP, ATP, NAD, NADP и GTP. Краситель обычно связывается с ферментом более прочно, чем истинный субстрат, при этом величины K_i составляют микромоли. Поэтому для связывания фермента с иммобилизованным красителем не всегда необходимы неспецифические взаимодействия. Более того, хотя исходный адсорбент называется голубым декстраном, декстрановый компонент служит лишь для связи с агарозой, являясь своего рода гигантским глобулярным удлиняющим мостиком, который имеет настолько

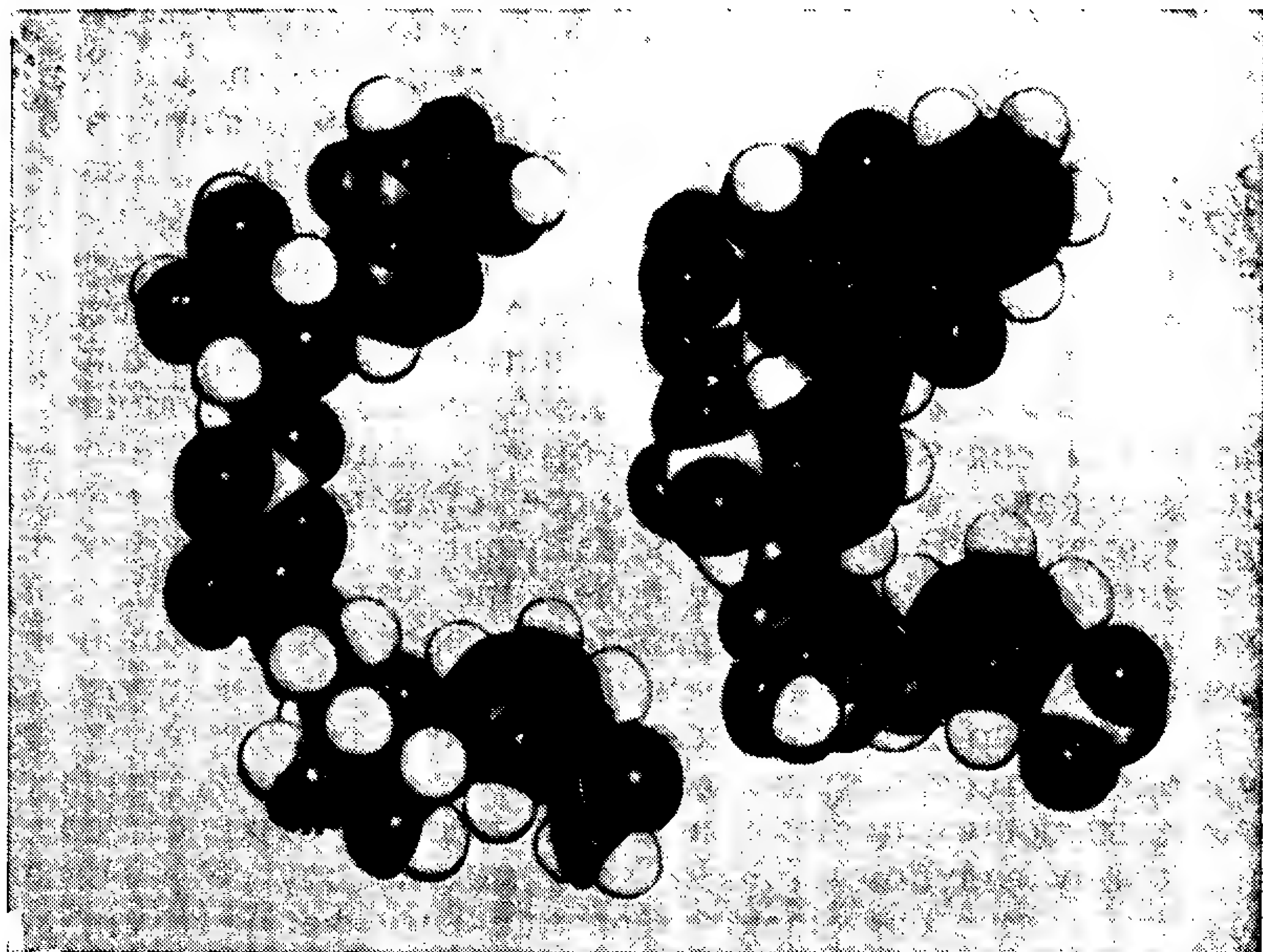


Рис. 4.45. Сходство трехмерных структур цибакрона голубого F3GA и NAD [90]. *Слева* — пространственная модель NAD, *справа* — ориентированная таким же образом модель цибакрона голубого F3GA.

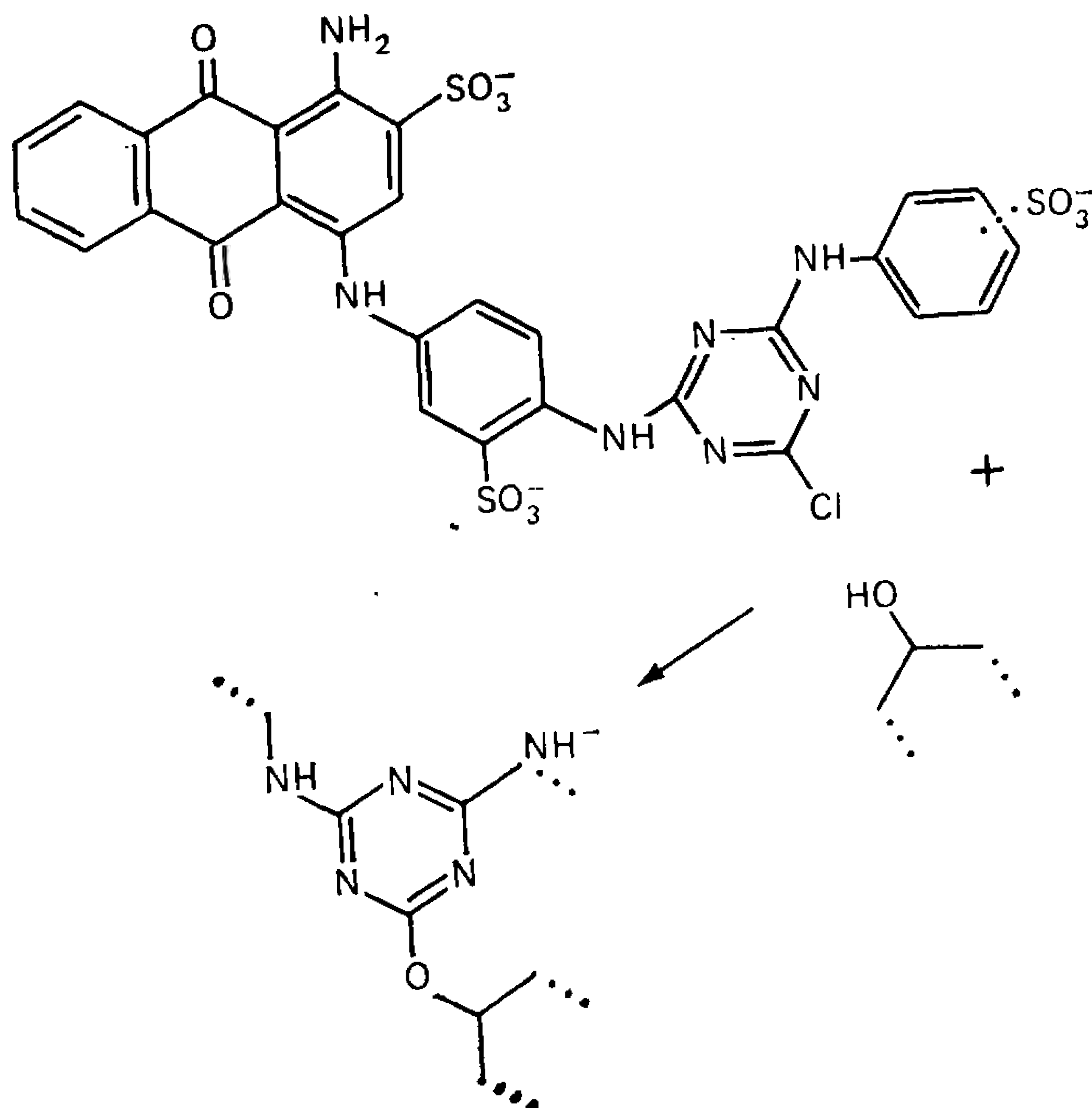


Рис. 4.46. Структура цибаркона голубого F3GA и взаимодействие его с гидроксильными группами.

большие размеры, что значительная часть пор внутри частиц агарозы для него недоступна. Тем не менее емкость голубого декстрана — агарозы достаточно высока, так как доля присоединенного активного лиганда, способного связывать белки, значительно выше, чем у обычного аффинного адсорбента.

Связывание голубого декстрана с агарозой — это чрезвычайно сложный процесс. Сам краситель достаточно реакционноспособен и может присоединяться непосредственно к неактивированной агарозе. Дело в том, что этот краситель, так же как и другие, описанные далее, был разработан для окрашивания биологических полимеров (шерсть, хлопок). Красители присоединяются к ним через триазинилхлоридную группу в слабощелочной среде (рис. 4.46). Агароза имеет много реакционноспособных гидроксильных групп, и прямое присоединение к ней красителя позволяет получить ряд замещенных адсорбентов с различной концентрацией красителя, обычно до 5 мкмоль·см$^{-3}$ (набухший гель). Емкость этих адсорбентов для белков в 10—20 раз превышает емкость истинных аффинных адсорбентов; для низкомолекулярных белков она составляет 20—30 мг·см$^{-3}$, но по мере увеличения размеров белковых молекул снижается

за счет ситового эффекта геля. При низкой ионной силе и относительно низких значениях pH окрашенные адсорбенты являются также эффективными катионообменниками, так как благодаря наличию множества отрицательных зарядов эти адсорбенты связывают оснóвные белки, которые могут и не иметь специфических нуклеотидсвязывающих центров. Если нет необходимости использовать это свойство, окрашенный адсорбент следует применять в условиях, при которых он ведет себя как слабый катионообменник, например при pH 7 или выше и ионной силе, равной 0,1.

Следует заметить, что прямое присоединение красителя к остову матрицы не уменьшает способность красителя связывать ферменты, т. е. в этом случае не нужен удлиняющий мостик. Как упоминалось в предыдущем разделе, причина, по которой при слабом взаимодействии фермента с лигандом необходим мостик, заключается не столько в возможности расположить лиганд на некотором расстоянии от матрицы, сколько в том, что введение мостика приводит к появлению неспецифических сил взаимодействия, усиливающих связывание. При величине $K_i(K_P)$, лежащей в пределах 10^{-6} М, и высоких значениях m_t для хорошей адсорбции белка на колонках с окрашенным адсорбентом не требуется дополнительных взаимодействий. Это видно из уравнения (4.5), например, при $m_t=0{,}1$ мМ, $p_t=0{,}05$ мМ и $K_P=0{,}001$ мМ $\alpha=0{,}98$. Из сказанного должно следовать, что окрашенные адсорбенты идеально приспособлены для белков, связывающих нуклеотиды, особенно в сочетании с аффинной элюцией. На практике же возникает ряд трудностей. Главная из них заключается в неспецифических силах связывания, которые могут быть причиной менее эффективной аффинной элюции. Кроме того, существует такое множество белков, связывающих нуклеотиды, что если *все* эти белки, присутствующие в смеси, адсорбируются на колонке, то высокой степени очистки получить не удастся.

В последние годы исследование большого числа красителей позволило улучшить избирательность метода, так как ферменты проявляют неодинаковое сродство к различным красителям. Сначала заметили, что NADP-зависимые ферменты связываются с проционовым красным HE-3B более прочно, чем с цибакроном голубым F3GA, тогда как большинство NAD-зависимых ферментов, наоборот, более прочно связывают цибакрон голубой F3GA [92]. Позже фирма Amicon выпустила еще три апробированных адсорбента [93]. Были проверены также другие красители, проявляющие специфичность по отношению к некоторым ферментам [94—96]. Вероятно, следует пожалеть, что сейчас существует такое разнообразие методик (включая рабочие параметры; см. ниже), так как из-за этого хроматография на ок-

рашенных адсорбентах становится весьма сложным процессом по сравнению с тем, что было в начальный период ее развития, когда выясняли лишь одно — «приклеивается» фермент к голубому декстрану или нет. Фирма Amicon предложила специальный набор, состоящий из пяти красителей; была проверена адсорбционная способность 90 различных красителей по отношению к целому ряду ферментов [97].

Существует несколько блестящих примеров успешного применения окрашенных адсорбентов, но в большинстве случаев их используют как определенный этап очистки, которому предшествуют или за которым следуют другие этапы. Правильное применение принципов аффинной элюции к процессу хроматографии, несомненно, способствовало бы усовершенствованию некоторых опубликованных методик.

Получение окрашенных адсорбентов

Окрашенные адсорбенты характеризуются тремя параметрами: 1) природой матрицы, 2) структурой красителя и 3) степенью модификации красителя. Рассматривая эти параметры по порядку, начнем с матрицы. Так же как и аффинные адсорбенты, она должна иметь открытую пористую структуру, для того чтобы крупные молекулы белка могли проникнуть внутрь частиц. Колонка, заполненная адсорбентом, должна иметь достаточную скорость потока. Желательно, чтобы в немодифицированном состоянии адсорбент был инертным. Хотя для специальных целей используется целый ряд различных носителей, наибольшее распространение получили гели агарозы, не имеющие каких-либо недостатков. Применяются также и декстрановые гели (сефадексы), но, для того чтобы белки легко проникали в них, они должны обладать очень рыхлой структурой. Такие гели, как сефадексы G-150 и G-200, очень тонкодисперсны и потому имеют плохие характеристики потока. Агарозы более пористы, но поскольку присоединение красителя лучше всего идет при температуре выше 40 °C, а в этих условиях агароза плавится, то для адсорбентов на основе обыкновенных гранул агарозы характерна относительно низкая степень модификации. Наибольшее применение находят агарозы, в которых поперечные сшивки образованы эпихлоргидрином, 2,3-дибромпропанолом или акриламидом. Такие имеющиеся в продаже продукты, как сефарозы CL-4B и CL-6B, сефакрил S-300, ультрагель и биогель A, представляют собой материалы, пригодные для получения окрашенных адсорбентов; некоторые из них выдерживают нагревание до 100 °C.

В качестве красителей используются активные триазиновые красители, носящие разные названия; их структура не всегда

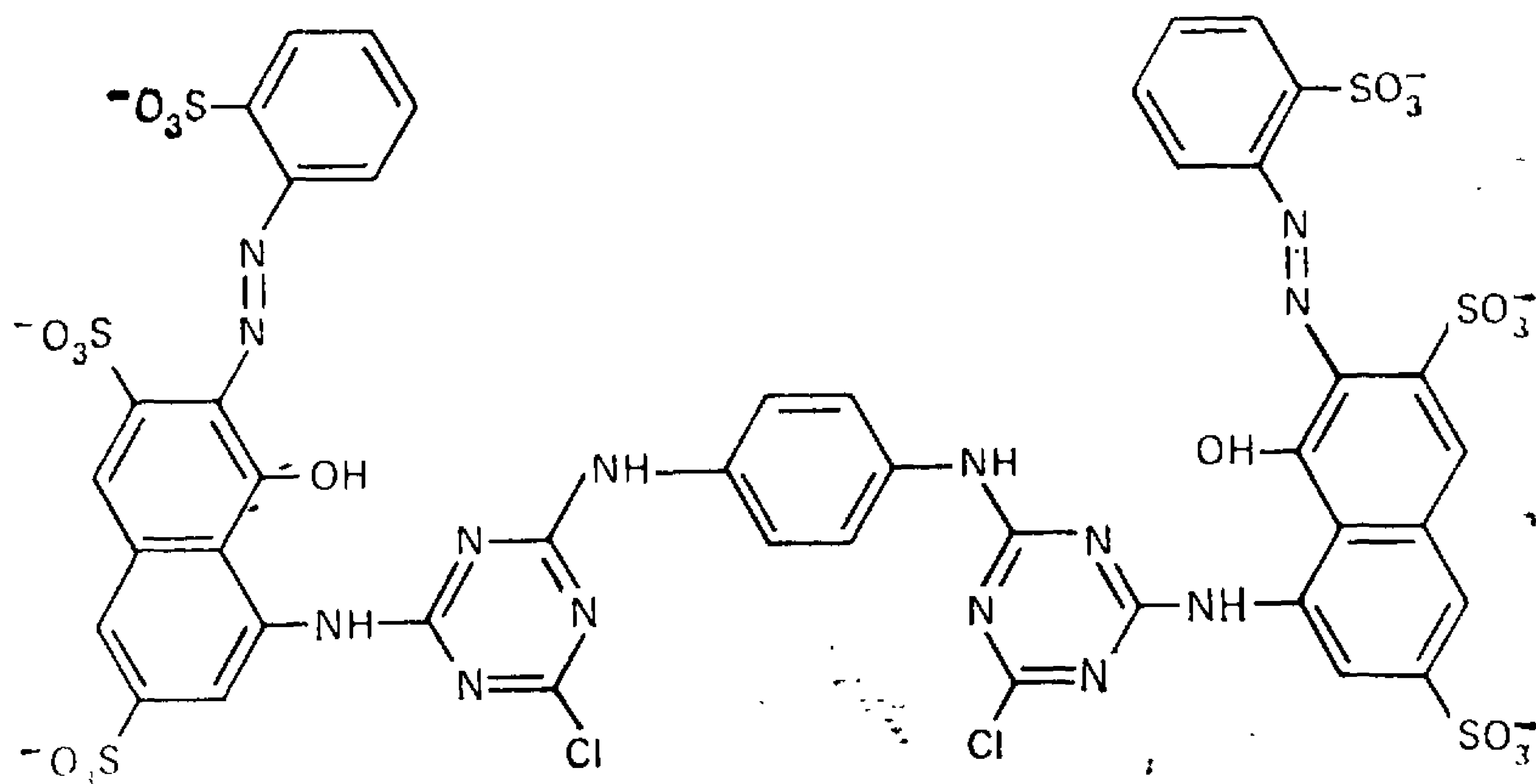


Рис. 4.47. Структура процинового красного НЕ-3В (реактивного красного 120), представляющего собой бифункциональный краситель. Один из триазинилхлоридов соединяется с агарозой в процессе синтеза адсорбента, другой же может быть гидролизован.

точно известна, так как они запатентованы. Серия красителей фирмы ICI, называемых процноновыми, частично совпадает с серией красителей, выпускаемых фирмой Ciba-Geigy под названием цибакроны. Красители различаются по номерам цветовых индексов, и им присваиваются «реактивные (цветовые) номера». Так, наиболее широко используемый цибакрон голубой F3GA известен также как «проционовый голубой Н-В», «цветовой индекс 61211» и «реактивный голубой 2» (структура показана на рис. 4.46). Еще один очень распространенный краситель — это проционовый красный НЕ-3В (реактивный красный 120), проявляющий наибольшую специфичность по отношению к NADP-связывающим ферментам (рис. 4.47).

Для специальных целей используются коричневые, зеленые, оранжевые, желтые и разных оттенков синие и красные красители. При таком их разнообразии вполне можно подобрать красители, проявляющие селективность в отношении каждой данной смеси ферментов. Тем не менее основные принципы адсорбции, осуществляемой благодаря гидрофобным и ионным взаимодействиям главным образом с нуклеотидсвязывающим доменом, справедливы для всех этих красителей. В настоящее время многие фирмы выпускают сорбенты на основе поперечно-сшитой агарозы, в высокой степени замещенной цибакроном голубым F3GA и проционовым красным НЕ-3В. Кроме того, в продаже есть адсорбент голубой декстран—агароза. Набор «Matrex» включает оба указанных выше красителя, а также фталоцианиновые красители (голубой, зеленый и оранжевый).

Для связывания красителей непосредственно с агарозой гель обрабатывают раствором красителя при pH 10—11 (Na_2CO_3 или NaOH) в присутствии соли (2% NaCl). При 30—40 °С связывание монохлортриазиновых красителей (проционовые ICI серии H) заканчивается через 2—3 дня, однако дихлортриазиновые красители (проционовые ICI серии MX) более реакционноспособны, и реакция завершается через 1—2 ч. Большая часть избыточного красителя гидролизуется и превращается в неактивную форму [97]. Использование поперечно-сшитой агарозы позволяет нагревать раствор до более высокой температуры. Было найдено, что очень высокая степень замещения процnoновыми H-красителями достигается в результате двухчасовой обработки агарозы 0,2%-ным раствором красителя при 80—90 °С с последующим добавлением свежей порции красителя в количестве 0,2 г на 100 мл и нагреванием смеси еще в течение 2 ч. Смесь оставляют на ночь для охлаждения и избыток красителя отмывают на бюхнеровской воронке большим количеством воды. Адсорбент можно хранить в солевом растворе с добавкой бактериостатических агентов, таких, как азид; перед использованием и после него адсорбент следует обработать раствором 6M мочевины — 0,5 M NaOH для удаления оставшегося слабосвязанного красителя.

Степень замещения — важный показатель при хроматографии на окрашенных сорбентах. Это справедливо и для других методов аффинной хроматографии. Если в связывании участвует не одна, а большее число молекул красителя, то этим достигается более прочная адсорбция (см. рис. 4.40). Кроме того, чем выше значение m_t, тем больше оказывается α [уравнение (4.5)]. Иногда бывает так, что высокозамещенный гель связывает нужный фермент так прочно, что последующий его выход оказывается очень низким. В таком случае следует использовать менее замещенные гели, уменьшая время обработки геля красителем в ходе приготовления адсорбента. Для получения устойчивых результатов следует фиксировать степень замещения [98].

Работа с окрашенными адсорбентами

Как при любой колоночной хроматографии, целью здесь является сорбция интересующего нас белка и его последующая элюция в условиях, сводящих к минимуму загрязнения другими белками. Так как очень многие белки потенциально способны связываться с окрашенными адсорбентами, необходимо подобрать такие начальные условия, при которых сорбция других белков уменьшилась бы и в то же время весь нужный белок остался бы на колонке. Адсорбция обычно ослабе-

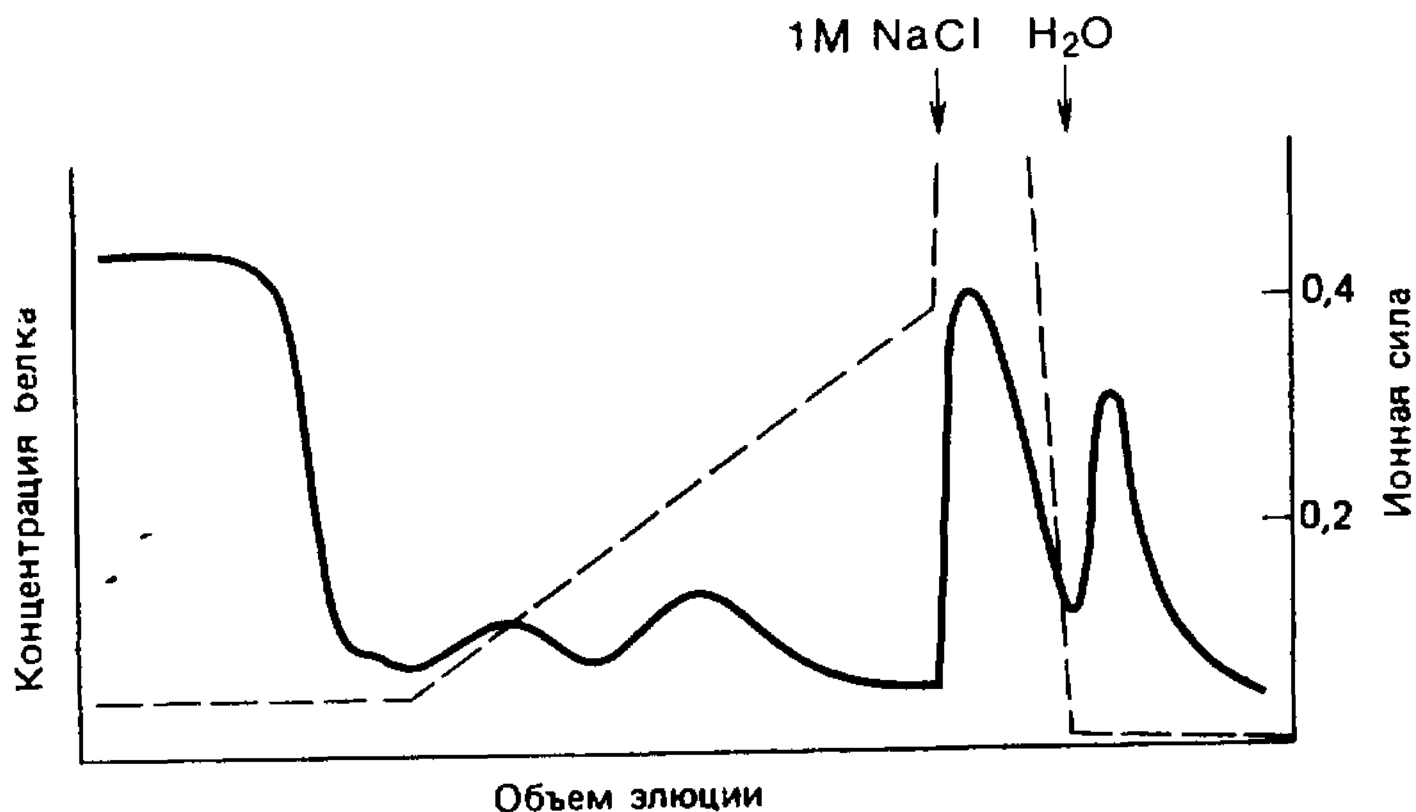


Рис. 4.48. Элюция белков с агарозы, модифицированной цибакроном голубым F3GA (неопубликованные данные автора). На колонку нанесен образец неочищенного экстракта *Zymomonas mobilis* в буфере с pH 6,5 (I=0,08). Элюцию проводят солевым градиентом (прерывистая линия) до концентрации 0,4 *М* NaCl, затем 1 *М* NaCl и, наконец, водой.

вает с увеличением ионной силы; для белков способность к ионному обмену представляется более важной, чем гидрофобные взаимодействия. Следовательно, и значение pH в этом случае — более важный показатель, чем при обычной аффинной хроматографии, причем при более высоких значениях pH адсорбция ослабевает. Сочетая специфические и неспецифические взаимодействия, ферменты можно связать с адсорбентом настолько сильно, что их с трудом удается элюировать. Например, если вклад гидрофобных взаимодействий велик, повышение концентрации соли будет усиливать эти взаимодействия и противостоять вытесняющему эффекту соли, который наблюдается при ионном обмене и специфических сорбционных взаимодействиях. Использование веществ, способных ослаблять гидрофобные взаимодействия, например детергентов (тритон X-100) хаотропных солей (LiBr, KCNS) или гликолей, может оказаться полезным при элюции таких белков. Заключительная промывка колонки водой также приводит к элюции некоторых белков (рис. 4.48).

Для аффинной элюции следует использовать истинные субстраты; хотя теоретически в этом качестве может выступать и свободный краситель, он оказывается менее специфичным. Так, для киназ используется ATP($\pm$Mg), для дегидрогеназ — NAD^+ (или предпочтительнее NADH, который более прочно связывается с большинством дегидрогеназ), для AMP-связывающих ферментов (например, для фруктозо-1,6-бисфосфата-

зы) — AMP. Однако, прежде чем использовать высокие концентрации дорогих лигандов, следует найти наилучшие условия для аффинной элюции. Это может быть буферный раствор, в котором фермент лишь начинает перемещаться вниз по колонке (α между 0,95 и 0,90). Добавление лиганда в концентрациях, не превышающих 10 K_L (если фермент имеет один центр связывания), или в меньших концентрациях (если существует несколько таких центров; см. рис. 4.28 и 4.29) приводит к быстрой элюции. Известно много примеров, когда для элюции фермента применялись ATP или NAD в концентрациях 10 мМ и выше просто потому, что состав элюирующего буфера не был идеальным. Такие методы оказываются совершенно непригодными при очистке больших количеств ферментов.

Было высказано предположение, что более эффективное разделение можно осуществить, используя двухколоночный метод [96]. Первая колонка должна содержать краситель, не связывающий нужный фермент. С помощью этой колонки удаляются очень сильно связывающиеся белки, которые в противном случае адсорбировались бы и занимали связывающие участки на второй колонке. Вторая колонка должна содержать краситель, имеющий высокое сродство к нужному ферменту, но относительно низкое к другим белкам. Чтобы найти оптимальные условия, необходимо провести обследование многих окрашенных адсорбентов, измеряя при этом активность фермента и содержание белка в исследуемой смеси до и после ее пропускания через колонку, а также после элюирования фермента подходящим буфером. Этот способ пригоден в тех случаях, когда для выделения необходимого фермента иными методами требуются большие количества адсорбента.

Наконец, следует отметить, что существуют белки, которые не связываются с функциональными нуклеотидами, но все же сорбируются на окрашенных носителях. Наиболее известный пример — сывороточный альбумин, но и такие белки, как фолликулостимулирующий гормон, интерферон, сывороточные липопротеины, фосфоглицератмутаза и фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолаза, также связываются с этими сорбентами [93]. В двух последних случаях субстраты ферментов (соответственно 2,3-бисфосфоглицерат и фруктозо-1,6-бисфосфат) могут быть использованы для биоспецифической элюции. Весьма вероятно, что помимо нуклеотидсвязывающих белков с окрашенными адсорбентами связываются ферменты, субстратами которых служат полиаминные соединения, и эти ферменты тоже можно элюировать их субстратами.

Емкость колонки может быть очень велика, но количество нужного фермента, связывающегося с адсорбентом, будет в значительной мере зависеть от количества других ферментов,

присутствующих в смеси. Таким образом, на ранних стадиях очистки иногда требуется большое количество адсорбента, а на поздних стадиях — достаточно маленькой колонки. Сырые экстракты применяют только в том случае, если интересующие нас ферменты относятся к наиболее прочно связывающимся белкам, поскольку они будут вытеснять все белки, адсорбирующиеся менее прочно. Следует отметить, что если сырые экстракты содержат фенолы или флавины, то эти вещества также связываются окрашенными адсорбентами и может понадобиться очень тщательная отмывка, чтобы удалить все поглощающие в УФ-свете вещества. Здесь опять-таки необходимо использовать метод проб и ошибок. Адсорбция белков занимает много времени, и адсорбция на окрашенных адсорбентах не составляет исключения из этого правила. Необходимо достаточное время для того, чтобы установилось равновесие между раствором и матрицей. Поэтому скорость протекания раствора через колонку обычно не должна превышать 20 см/ч. Однако очень сильно сорбирующиеся ферменты можно очистить и при больших скоростях потока. Пожалуй, наиболее ярким примером в этом отношении служит очистка дрожжевой АМР-киназы [12], при которой скорость потока была равна 40 мл/мин на колонке с сорбентом «Affi-Blue» диаметром всего 2,5 см, т. е. примерно 500 см/ч. Сходные скорости потока достигались прокачиванием неочищенного экстракта дрожжей через колонку с сефарозой CL-4B, связанной с проционом НЕ-3В. На колонке удерживались при этом вся глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа и бóльшая часть 6-фосфоглюконатдегидрогеназы. Для столь сильно сорбирующихся ферментов можно использовать технику сорбции в объеме (см. разд. 4.9) либо применять адсорбенты, модифицированные красителями типа проционового желтого Н-А (Amicon Matrex orange) или проционового пурпурного МХ-G, которые связывают белки менее прочно, чем другие окрашенные адсорбенты.

Хроматография на окрашенных адсорбентах — быстро развивающаяся область; просматривая при подготовке этой главы новые публикации, в том числе и работы моей лаборатории, я убедился в том, что об этом методе следует подумать, прежде чем приступать к реализации плана очистки того или иного фермента, особенно если этот фермент связывает нуклеотиды. Что касается цибакрона голубого, то он, по-видимому, ничем особенным не отличается от других красителей; по своей способности связывать белки он попадает в середину ряда красителей. Широкое распространение окрашенных адсорбентов обусловлено двумя важными факторами: а) их относительно высокой связывающей емкостью и б) дешевизной. Если это играет важную роль для решения данной проблемы, хрома-

тографию на окрашенных адсорбентах, безусловно, следует испытать, прежде чем использовать обычные аффинные адсорбенты.

4.7. ИММУНОАДСОРБЕНТЫ

Абсолютно специфическим адсорбентом для любого фермента или белка является антитело к этому белку, связанное с нерастворимой матрицей. Антитела высокоспецифичны и имеют очень высокое сродство к тем белкам, против которых они получены. Следовательно, на колонке с соответствующим иммуноадсорбентом можно, как правило, осуществить гораздо более избирательную сорбцию, чем на аффинном адсорбенте любого другого типа; иммуноадсорбенты, представляющие собой специализированные биоспецифические адсорбенты, описаны в разд. 4.5.

Поскольку получение антител — это сложный процесс, иммуноадсорбционные колонки до сих пор еще не нашли широкого применения. Однако новая технология получения моноклональных антител может революционизировать этот способ очистки ферментов. Ниже мы сначала расскажем о методах и проблемах, связанных с применением обычных поликлональных антител, а затем кратко наметим пути преодоления большинства возникающих при этом трудностей.

Основные принципы

Эти принципы заключаются в следующем:

1. Фермент, выделенный из источника, эволюционно далекого от иммунизируемого животного (обычно кролика), очищают традиционными методами.
2. Для получения антител к этому ферменту кролика иммунизируют с использованием обычной для этой цели техники. Взятие крови у кролика и определение в ней антител осуществляются методами иммунопреципитации, двойной диффузии или значительно более чувствительным радиохимическим методом, который состоит в выявлении комплексов антиген — антитело с помощью ^{125}I-меченого «белка А» (один из белков *Staphylococcus aureus*, прочно связывающийся с цепями иммуноглобулина IgG [99]).
3. Антитела из сыворотки крови кролика частично очищают (обычно достаточно осаждения сульфатом аммония при 33%-ном насыщении).
4. Антитела связывают с адсорбентом, например с активированной бромцианом или тозилхлоридом агарозой (разд. 4.5).

5. Сырой или частично очищенный препарат фермента пропускают через колонку с антителами. Колонку промывают.
6. Фермент элюируют.

Трудности обычно возникают на стадиях 1, 2 и 6. Мы будем исходить из того, что стадия 1 осуществлена и выделен по крайней мере частично очищенный фермент. Чтобы вызвать у кролика образование большого количества антител, достаточно менее одного миллиграмма чистого фермента. Поддержание высокого титра антител в крови достигается повторными ежемесячными инъекциями по 0,1—0,3 мг фермента. Однако некоторые белки значительно более антигенны, чем другие, так что даже следы их примесей в препарате фермента, не определяемые обычными аналитическими методами (разд. 9.1), могут вызвать весьма интенсивное образование антител у кролика. Впоследствии эти антитела будут связываться со своими антигенами, присутствующими в больших количествах в неочищенных препаратах фермента. Таким образом, селективность полученных антител окажется значительно более низкой, чем ожидалось. Эта проблема приобретает особую остроту, если очищаемый фермент является относительно слабым антигеном.

Один весьма успешный способ преодоления этой трудности заключается в отделении нужного фермента от других белков с помощью гель-электрофореза [100]. Образец фермента наносят на довольно крупнопористый гель и электрофорез продолжают до тех пор, пока фермент четко не отделится от всех сопутствующих примесей. После локализации положения фермента в геле последний разрезают и слой, содержащий фермент, растирают до получения тонкой суспензии, состоящей из полиакриламидного геля и фермента. Эту суспензию и используют затем для первой инъекции; нескольких сотен микрограммов белка оказывается вполне достаточно. Иммуноглобулины, полученные таким способом, содержат до 10% антител к нужному ферменту. Остальные 90% — это относительно неспецифические иммуноглобулины, присутствующие в организме животного к моменту иммунизации. К 1 см^3 агарозы можно присоединить десятки миллиграммов иммуноглобулина [101]. При этом на 1 см^3 геля будет приходиться до 1 мг специфических антител. Но, поскольку молекулы антител присоединяются к адсорбенту таким образом, что это приводит в большинстве случаев к потере их способности связывать антиген, концентрация активных антител будет составлять, вероятно, лишь около 0,1 мг/см^3. Если каждая молекула этих антител связывает одну молекулу антигена с близким значением молекулярной массы, то емкость такой колонки будет порядка 0,1 мг/см^3, это небольшая, но вполне достаточная емкость для очистки малых

количеств фермента из исходной смеси. Один кролик может дать до 1—2 г иммуноглобулинов; это составляет несколько сотен кубических сантиметров адсорбента, его достаточно для очистки по меньшей мере 10 мг фермента в каждом цикле использования колонки. Таким образом, получение достаточного количества фермента для выработки антител не представляет серьезной проблемы, особенно если колонка может быть использована несколько раз.

Заключительная стадия — элюция с колонки — часто оказывается камнем преткновения для всего процесса. Взаимодействия между антигеном и антителом характеризуются константами диссоциации порядка 10^{-8}—10^{-12} М. Подставив эти значения как величины K_P в уравнение (4.5), мы получим значение α, близкое к единице. Ослабить специфические взаимодействия не просто. Хотя иммуноглобулины — весьма прочные молекулы и могут выдержать достаточно жесткие условия, необходимые, чтобы разрушить специфические взаимодействия, это не обязательно справедливо в отношении вытесняемого фермента. Так, при pH 2—3 антиген будет вытеснен, а оставшиеся на колонке антитела сохранят свою активность, так что колонку можно будет снова использовать; однако весьма вероятно, что при pH 3 фермент будет разрушен. Сходные последствия обычно наблюдаются при использовании высоких концентраций мочевины и органических растворителей с целью соответственно уменьшить число водородных связей и ослабить гидрофобные взаимодействия. Применение высоких концентраций солей может быть успешным, если наблюдаются преимущественно электростатические взаимодействия, но в этих условиях усиливаются гидрофобные связи. Хаотропные соли, такие, как тиоцианат или иодид, бромид лития, хлористый магний и так называемые деформирующие буферы, например имидазолцитрат, дают довольно хорошие результаты, но опять-таки необходимые концентрации этих веществ могут вызывать денатурацию десорбированного фермента. Была описана методика быстрой элюции денатурирующим агентом, позволяющая получить активный антиген [102]. Эта методика заключается в том, что адсорбент помещают в верхнюю часть обессоливающей колонки, и поэтому, как только фермент покидает слой адсорбента, он сразу же отделяется от элюирующего агента (рис. 4.49). При малых количествах белка контакт с элюирующим агентом не превышает 1 мин, и за это время может произойти лишь незначительная денатурация белка.

В последнее время были предложены успешные методы элюции с помощью *холодной дистиллированной воды* [103, 104]. В обеих работах использованы ферменты из растений. Предстоит еще выяснить, насколько общим является этот метод, по-

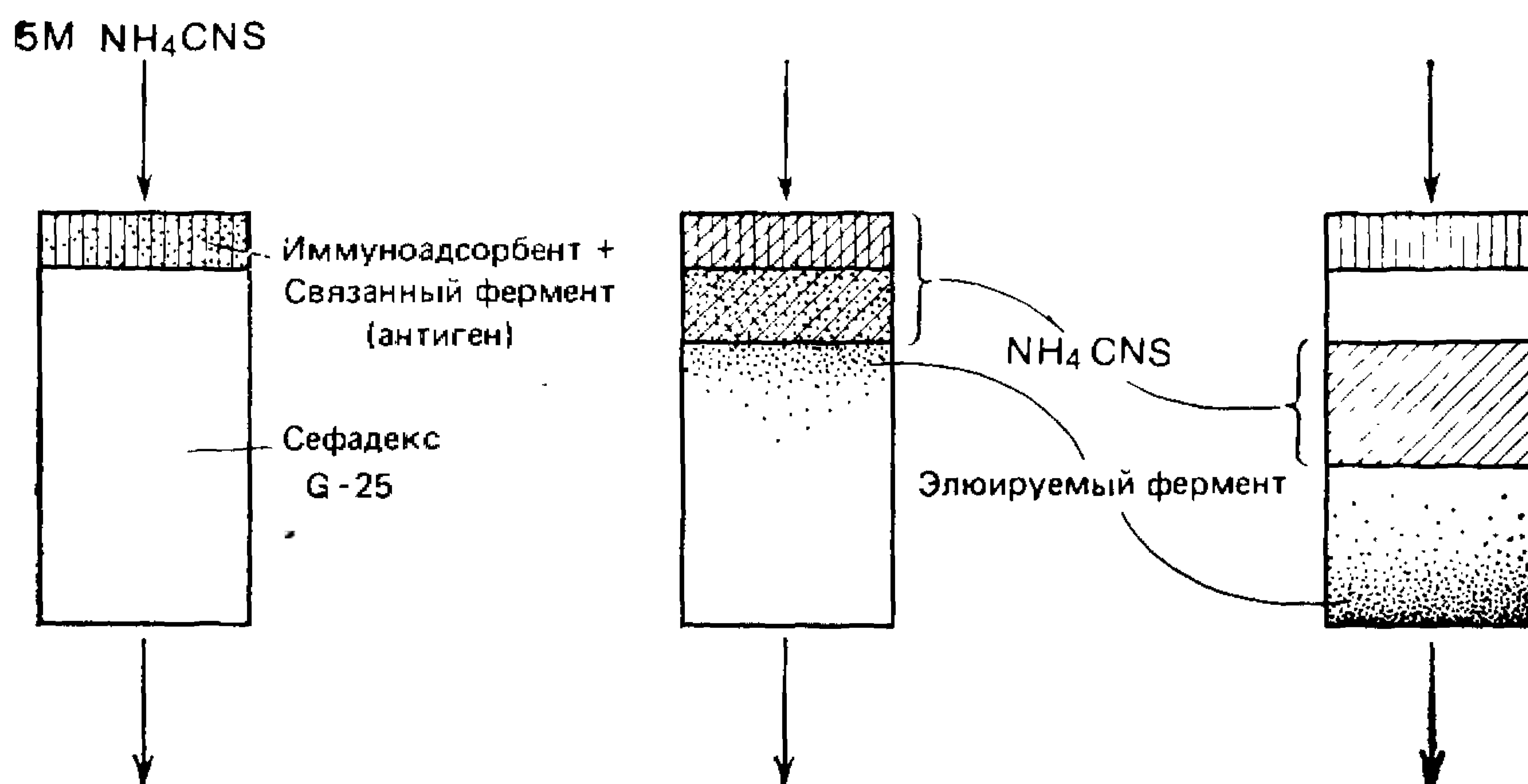


Рис. 4.49. Удаление антигена с иммуноадсорбента с помощью хаотропной соли и быстрое отделение соли от антигена (очищаемого белка).

скольку непонятно, чем обусловлена его эффективность помимо того, что при этом существенно ослабевают гидрофобные взаимодействия. Возможно также, что благодаря низкой ионной силе возникает какое-то специфическое конформационное изменение *фермента.*

Другой метод удаления антигена — это электрофорез [87]. При том значении pH, при котором антиген достаточно сильно заряжен, небольшая доля этого антигена под действием электрического тока медленно перемещается с поверхности адсорбента в раствор без существенного разбавления, происходящего обычно при простом пропускании буфера через колонку. В одном из новых методов используется расщепляемый удлиняющий мостик [105]. Антитело присоединяют к агарозной матрице через сложноэфирную связь по фенольному гидроксилу. Эта связь разрывается химическим путем в имидазол-глициновом буфере при pH 7,4 с отщеплением комплекса антиген—антитело. Этот метод, правда, не позволяет отделить антитело от антигена, так что адсорбент можно использовать только однократно.

В идеале удаление адсорбированного фермента с колонки должно происходить в результате того, что величина константы диссоциации изменяется примерно от 10^{-7} до 10^{-4} М, т. е. благодаря 1000-кратному снижению сродства без денатурации антигена. Чтобы получить исходные значение константы диссоциации около 10^{-7} М (вместо более обычного сродства, превышающего эту величину на несколько порядков), целесообразно варьировать источник, из которого выделяют препарат фермен-

та. Например, если хотят получить фермент человека, а комплекс этого фермента с антителом кролика слишком прочен, то можно сначала очистить такой же фермент другого животного, например лошади. Комплекс фермента лошади с полученным к нему антителом кролика будет прочным, но фермент человека не будет давать слишком сильную перекрестную реакцию с антителами к ферменту лошади. Следовательно, очистка фермента человека на колонке с антителами к ферменту лошади может оказаться более успешной. Практическое преимущество такого подхода состоит в том, что на начальных стадиях очистки можно использовать большое количество более доступного исходного материала (фермент лошади).

Моноклональные антитела

Большинство проблем, возникающих при использовании поликлональных антител, может быть решено с помощью новой технологии получения моноклональных антител [106]. Применяемые при этом оборудование и методы достаточно просты, но к ним предъявляются более высокие требования, чем при производстве обычных антител. Моноклональные антитела по сравнению с поликлональными имеют следующие преимущества при получении иммуноадсорбентов:

1) Используемый препарат фермента не нуждается в очистке; процесс скрининга подходящих клонов позволяет избавиться от антител к другим белкам. В этом случае достаточно 1%-ной «чистоты» исходного фермента [107].
2) Поскольку иммунизация обычно проводится на мышцах, требуется очень небольшое количество антигена (достаточно всего 50 мкг).
3) Можно обнаружить много различных клонов, продуцирующих антитела к разным антигенным детерминантам нужного фермента. Константы диссоциации комплексов этих антител с ферментом будут различаться. Можно отобрать клоны, продуцирующие антитела с K_d в желаемой области (10^{-6}—10^{-8} М), тем самым решив проблему, связанную с элюцией.
4) Подходящий клон, будучи однажды найден, может храниться в жидком азоте и быть, таким образом, неисчерпаемым источником антител, которые можно получать от многих особей данного вида животных. Источник не иссякает со смертью животного.
5) Поскольку моноклональные антитела — это чистый препарат антител, *все* молекулы связанного на адсорбенте иммуноглобулина специфичны по отношению к нужному ферменту. Таким образом, емкость иммуноадсорбента обычно увеличивается по меньшей мере в 10 раз.

Первые крупные успехи в использовании моноклональных иммуносорбентов были связаны с очисткой интерферона человека [107], а также сахаразы/изомальтазы из щеточной каемки тонкого кишечника [108]. Со времени опубликования этих данных, без сомнения, появились и другие сообщения на ту же тему.

Поскольку иммуноадсорбенты (поликлональные и моноклональные) обладают высоким сродством к выделяемому ферменту, их удобно использовать для адсорбции «в объеме» (см. разд. 4.9). Однако образование комплекса между антигеном и антителом — обычно медленный процесс; следовательно, сорбируя фермент «в объеме» или на колонке, необходимо, чтобы было достаточно времени для завершения адсорбции. Важно также, чтобы в ходе элюции скорость потока была очень низкой; может оказаться полезным даже совсем прекратить пропускание элюента [104].

4.8. РАЗЛИЧНЫЕ АДСОРБЕНТЫ

Неорганические адсорбенты

Все до сих пор рассмотренные в этой главе адсорбенты, за исключением некоторых упомянутых синтетических полимеров, построены на основе биологических матриц. Существует также ряд неорганических веществ, использовавшихся для адсорбции белков, — в основном оксиды, нерастворимые гидрооксиды и фосфаты. Главное место среди них занимает гидроксифосфат кальция, который в кристаллическом состоянии известен как гидроксилапатит. Использование гидроксилапатита и студнеобразной формы «геля фосфата кальция» будет описано ниже в заключительной части этой главы, посвященной адсорбции «в объеме». Тем не менее краткое описание этих адсорбентов даст представление о пригодности неорганических материалов для адсорбции белков. Одно из отличительных преимуществ таких материалов, особенно при крупномасштабном или промышленном применении, — это их дешевизна; часто не стоит труда очищать их после однократного использования.

В отношении механизма действия неорганические материалы менее понятны по сравнению с ионообменниками или аффинными сорбентами. Кристаллические поверхности состоят из заряженных ионов, ассоциированных с гидратной водой, и потому электростатические взаимодействия играют важную роль при сорбции на них белков. Однако рядом с любой положительно заряженной областью на поверхности кристалла находится отрицательно заряженный участок, и наоборот. Следовательно, взаимодействие скорее носит характер полярного диполь-ди-

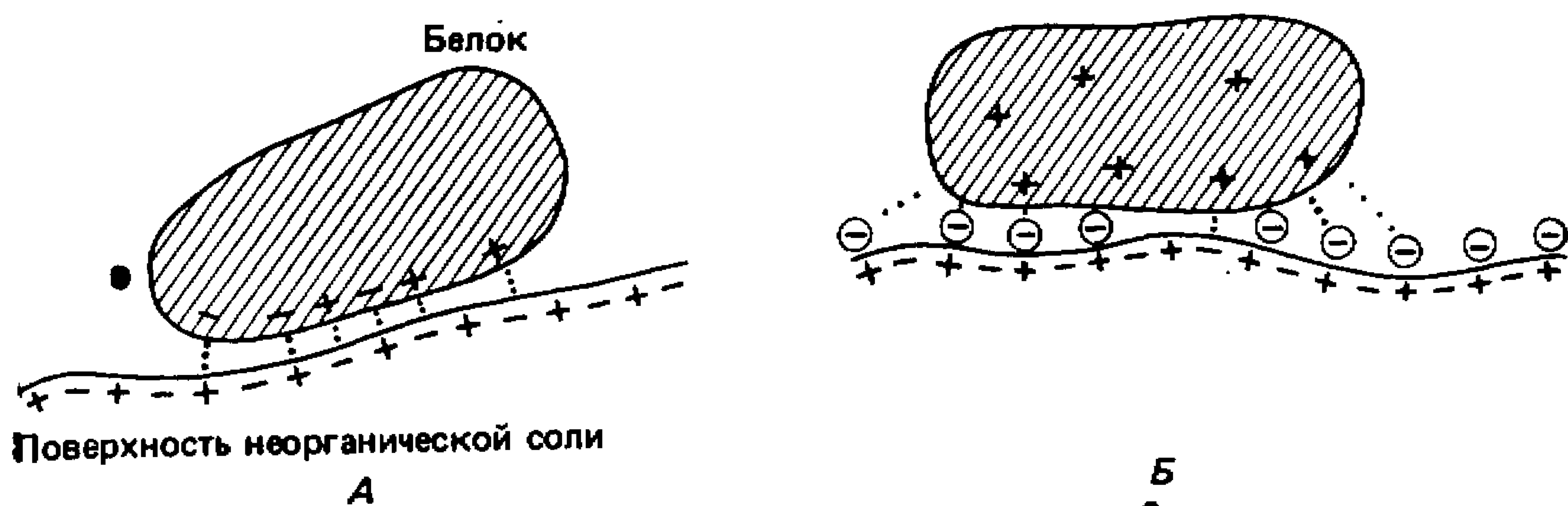


Рис. 4.50. Электростатические взаимодействия белков с поверхностью неорганической соли. *А*. Простое взаимодействие. *Б*. Взаимодействие в присутствии ионов буфера.

польного связывания, чем ионного обмена (рис. 4.50, *А*). При нейтральных значениях pH белки, по всей вероятности, имеют соседствующие положительные и отрицательные группировки. Таким образом, независимо от значения изоэлектрической точки адсорбция будет скорее всего происходить при pH от 6 до 9.

Однако на практике все оказывается значительно сложней, чем в теории. При адсорбции всегда используют буферные растворы, обычно фосфат, и ионы буфера сами сорбируются на неорганических материалах. Поэтому гидроксилапатит может иметь полностью отрицательно заряженную поверхность для связывания белка (рис. 4.50, *Б*). Повышение концентрации буфера приводит к конкуренции между белком и ионами буфера за заряженные участки на поверхности адсорбента, что напоминает типичную картину ионного обмена. Детальное обсуждение этих эффектов, а также количественные данные по адсорбции некоторых белков на гидроксилапатите и TiO_2 представлены в работах [109, 110].

Как и в случае многих других методов очистки ферментов, единственный способ выяснить, пригоден ли данный метод для такой цели, — это испытать его. Адсорбции способствует низкая концентрация соли, однако необходима достаточная буферная емкость, чтобы предотвратить нежелательные локальные изменения pH вблизи высокополярной поверхности адсорбента. Элюция белков происходит при более высокой концентрации соли. Ее можно добавлять сразу в один прием или, в случае колоночной хроматографии, вводить постепенно в виде градиента.

Некоторые применявшиеся неорганические адсорбенты перечислены в табл. 4.8. Часто эти адсорбенты используют не как хроматографические материалы и даже не применяют их в обычном цикле адсорбция — элюция, а с их помощью только связывают нежелательные примеси. Системы «объемного» или

Таблица 4.8. Некоторые неорганические адсорбенты, часто используемые для очистки белков

Гель окиси алюминия C_γ (гель и кристаллический порошок)	
Бентонит (силикатный порошок)	
Фосфат кальция:	«Состарившийся» гель
	Брушит
	Гидроксилапатит
Окись титана	
Гель гидроокиси цинка	

колоночного типа могут адсорбировать различные ненужные белки, другие макромолекулы и низкомолекулярные соединения, оставляя нужный фермент в растворе готовым для следующей стадии очистки. В качестве примера можно привести очистку дрожжевой фосфоглюкозоизомеразы (КФ 5.3.1.9) с использованием как гидроокиси цинка, так и бентонита в качестве адсорбентов «объемного» типа (табл. 4.9) [111]. Гидроокись цинка получают in situ, смешивая ацетат цинка и щелочь в таком соотношении, чтобы pH был около 8. На гидроокиси цинка сорбируются многие белки, но изомераза остается в растворе. После удаления геля гидроокиси с помощью центрифугирования добавляют бентонит, который сорбирует дополнительное количество белков, однако и в этом случае изомераза не связывается с адсорбентом. Бентонит состоит из очень легких студенистых частиц, так что требуется относительно высокая центробежная сила для его осаждения. Эти две стадии дают 20-кратную очистку сырого экстракта, не подвергавшегося каким-либо предварительным обработкам.

Таблица 4.9. Очистка фосфоглюкозоизомеразы из экстракта дрожжей с помощью адсорбции примесных белков «в объеме» [111]

	Белок, мг	Ферментативная активность, ед.	Удельная активность
Сырой экстракт	30 500	173 000	5,7
Обработка $Zn(OH)_2$	6 630	115 000	17,3
Обработка бентонитом	905	109 000	120

Гели гидроксилапатита и фосфата кальция

Уже в течение нескольких десятилетий известно, что гидратированные гели фосфата кальция можно успешно использовать для избирательной адсорбции белков и их последующей элюции высокими концентрациями солей. Первоначальный и до сих пор широко применяемый способ получения адсорбента состоял в том, что хлористый кальций смешивали с трехоснов-

ным фосфатом натрия и промывали гелеобразный осадок дистиллированной водой. Затем гель оставляли для «созревания» в течение нескольких месяцев; это продолжалось до тех пор, пока он не приобретал оптимальные характеристики по своей плотности [112]. Гелеобразная консистенция этого материала не позволяет применять его непосредственно в колонках из-за плохих фильтрационных параметров, однако он идеален для сорбции в объеме. Гель фосфата кальция имеет высокую емкость вследствие большой площади поверхности на единицу веса; до развития ионообменной хроматографии он широко использовался для очистки белков. Его применение незаслуженно забыто в последнее время в связи с распространением более сложных адсорбентов и производством фосфата кальция с частицами контролируемых размеров, предназначенного специально для хроматографии. Были предприняты попытки использовать этот кальций-фосфатный гель, смешанный с целитом (вспомогательный фильтрующий материал), для хроматографического разделения белков в колонках. Однако этот метод имеет мало преимуществ по сравнению с использованием кристаллического гидроксилапатита, предназначенного специально для колонок. Главное преимущество геля фосфата кальция заключается в возможности его применения для быстрой адсорбции белков «в объеме».

Чтобы получить гидроксилапатит — кристаллический, пригодный для колонок фосфат кальция, — 0,5 М растворы $CaCl_2$ и Na_2HPO_4 медленно смешивают с 1 М раствором NaCl. При этом образуется брушит — $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$. При кипячении брушита с NaOH он превращается в гидроксилапатит — $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ [113].

Кристаллические частицы в колонке адсорбируют белки на своей поверхности. Белки не могут проникать в частицы кристаллов, подобно тому как это происходит при использовании матриц на биологической основе. Поэтому адсорбционная емкость их ограниченна. В самом деле монослой типичного белка на поверхности сферических частиц диаметром 0,1 мм составляет не более 0,1 г/см^3. Гидроксилапатит имеет более высокую емкость, вероятно, из-за трещин и разломов кристаллических частиц, что приводит к значительному увеличению эффективной поверхности. Все же ограниченная емкость кристаллического фосфата кальция позволяет применять его при очистке белков в основном на одной из заключительных стадий процедуры, а часто и на самой последней стадии, после того как все остальные методы не привели к получению гомогенного вещества.

Подробные исследования поведения белков на гидроксилапатите позволили Бернарди [109] сделать заключение, что адсорбция основных белков, положительно заряженных при ис-

пользуемом значении pH, отличается от поведения нейтральных или кислых белков. Все белки, сорбированные при низких концентрациях фосфата калия, можно элюировать, повысив концентрацию фосфата, причем осно́вные белки требуют более концентрированных буферных растворов, чем кислые. Другие соли, например KCl и NaCl, не эффективны при элюции кислых белков; то же самое справедливо и в отношении $CaCl_2$ (вплоть до 3М концентрации). С другой стороны, осно́вные белки элюируются хлоридами, и для вымывания с гидроксилапатита таких осно́вных белков, как лизоцим или рибонуклеаза, достаточно очень низких концентраций $CaCl_2$ (1—10 мМ). Из этих опытов был сделан вывод, что кислые белки лучше всего сорбируются участками на поверхности кристаллов, занятыми ионами кальция, причем такие анионы, как Cl^-, не способны эффективно вытеснять эти белки, так как имеют низкое сродство к участкам, занятым Ca^{2+}. С другой стороны, осно́вные белки связываются более прочно с ионами PO_4^{n-} и могут достаточно эффективно вытесняться моновалентными катионами и очень эффективно — ионами Ca^{2+}, которые имеют высокое сродство к фосфат-ионам. Хотя эти теоретические и модельные опыты открывают некоторые новые возможности для разделения белков на гидроксилапатите, реальные примеры использования селективной элюции солями весьма немногочисленны. Обычно применяемым способом остается элюция градиентом фосфатного буфера, возможно, из-за того что альтернативные способы просто игнорируются.

Недавно фирма LKB разработала новый сорбент HA-Ultrogel, представляющий собой шарики геля, покрытые гидроксилапатитом. Этот сорбент по своим свойствам явно превосходит все другие формы гидроксилапатита: в частности, он имеет высокую (относительно) адсорбционную емкость. Детали его применения приведены в инструкции фирмы LKB [114].

Гидрофобные адсорбенты

В ходе создания носителей для аффинной хроматографии было проведено множество «контрольных» опытов, в частности изучено поведение матриц, содержащих удлиняющие «мостики» без лиганда. В большинстве случаев, как и следовало ожидать, адсорбции на таких носителях не отмечалось. Однако в некоторых случаях было обнаружено, что ферменты прочно связывались с гексаметиленовыми «мостиками», даже если они не содержали заряженных концевых аминогрупп или карбоксильных групп, которые могли бы функционировать как ионообменники [115]. Эти наблюдения послужили отправным пунктом для развития методов гидрофобной хроматографии, основанных

на связывании белка в результате взаимодействия между алифатической цепью адсорбента и соответствующим гидрофобным участком на поверхности белка [116, 117]. Это и есть тот «неспецифический» вклад в аффинную сорбцию, который в наибольшей степени способствует прочному связыванию белков на носителе (см. разд. 4.5).

Хотя при низких концентрациях соли с короткими иммобилизованными алифатическими цепями связывается относительно мало белков, гидрофобную хроматографию можно распространить практически на все белки, поскольку гидрофобные взаимодействия усиливаются с повышением концентрации соли. В частности, соли, проявляющие наибольшую эффективность при высаливании (см. разд. 3.3), такие, как сульфат аммония, характеризуются наибольшим усилением гидрофобных взаимодействий. Это объясняется тем, что в основе обоих эффектов лежат одинаковые механизмы: при высаливании основной причиной агрегации служит усиление гидрофобных взаимодействий между белками. Следовательно, при высоких концентрациях соли большинство белков можно адсорбировать на гидрофобных группах, связанных с инертной матрицей (однако сама матрица может и не быть инертной; см. ниже).

К типичным гидрофобным адсорбентам, имеющимся в продаже, относятся адсорбенты, в состав которых входят линейные алифатические цепи, содержащие 4, 6, 8 и 10 атомов углерода (P. L. Biochemicals), а также адсорбенты с такими же цепями, но имеющими концевую аминогруппу (рис. 4.51, *А*). Адсорбенты последнего типа предназначены преимущественно для присоединения аффинных лигандов, однако они сами по себе представляют интересные гидрофобные адсорбенты, в которых имеется группа, потенциально способная к образованию водородных связей и электростатическим взаимодействиям. Важно также отметить, что эти адсорбенты делаются на основе агарозы, активированной бромцианом, и поэтому содержат положительно заряженную группу на другом конце алифатической цепи (см. рис. 4.35). Доступны также фенилагарозы, в которых бензольное кольцо связано с матрицей через простые эфирные связи с глицерином (например, фенилсефароза; рис. 4.51, *Б*).

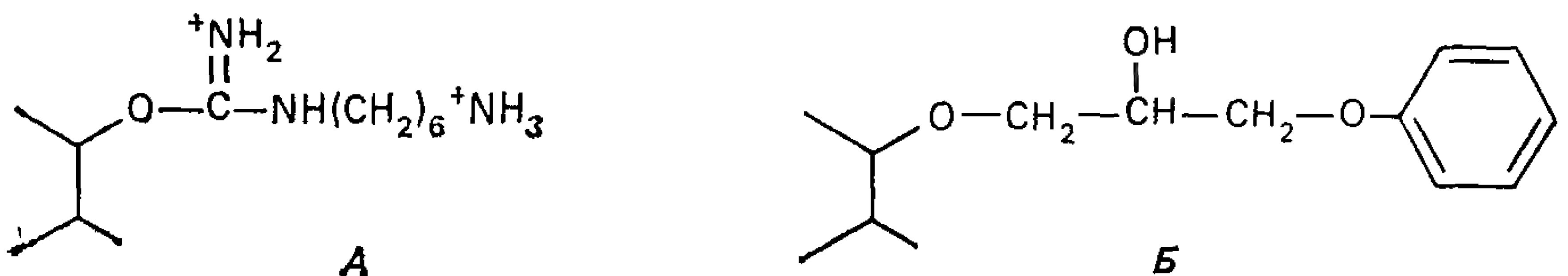


Рис. 4.51. *А*. Структура аминогексилсефарозы (P. L. Biochemicals Aghexamine). *Б*. Структура фенилсефарозы (Pharmacia).

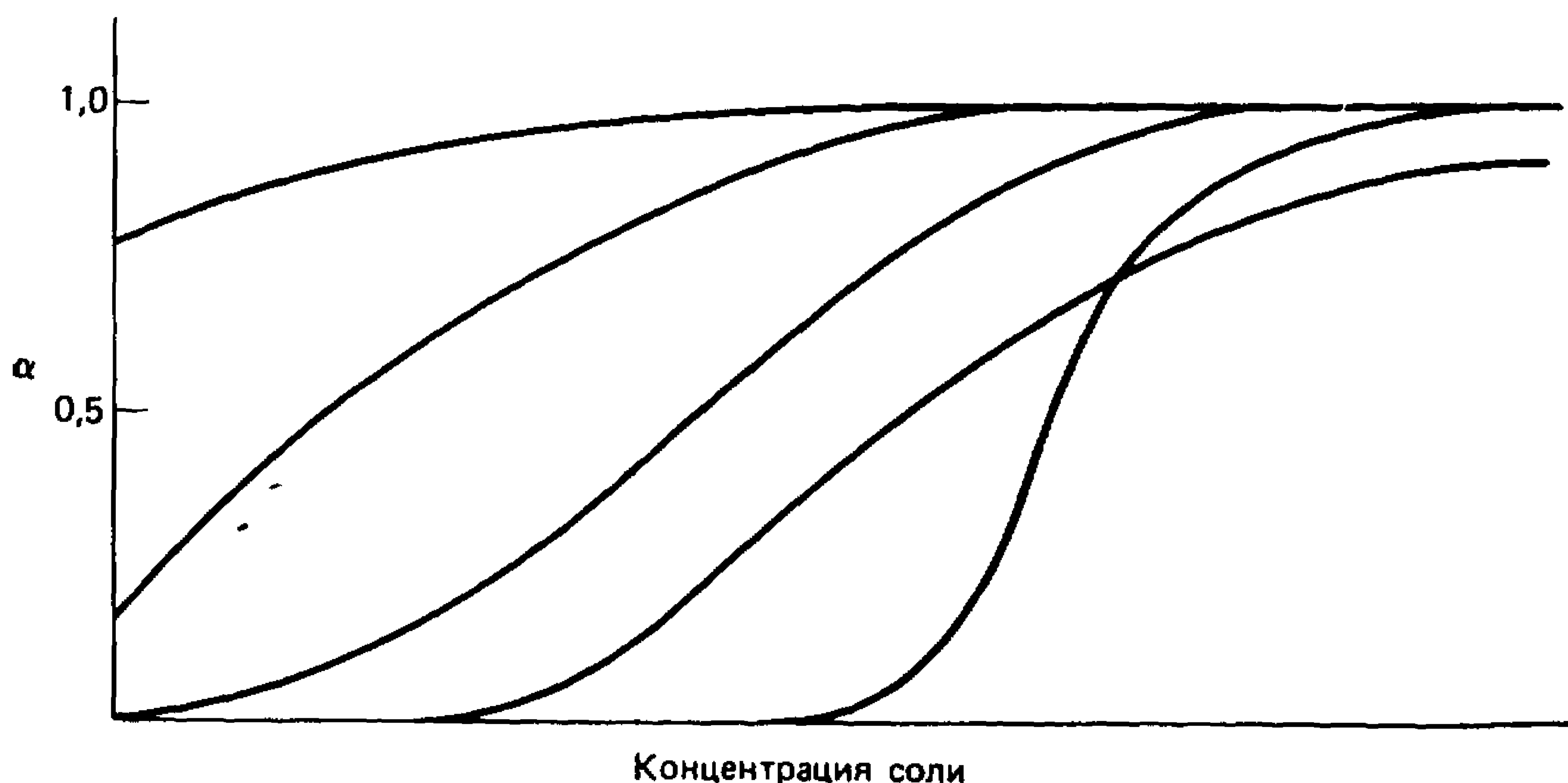


Рис. 4.52. Изменения коэффициента распределения α в зависимости от концентрации соли для гипотетического ряда из пяти белков на гидрофобном адсорбенте.

Как и в случае окрашенных адсорбентов (см. разд. 4.6), здесь также можно практически неограниченно варьировать природу заместителей, однако все эти адсорбенты ведут себя сходным образом. Чтобы сделать правильный выбор адсорбента, достаточно проверить образцы фенил-, октил-, гексил- и аминогексил-агароз, которые удовлетворяют всем потенциально возможным требованиям.

Функционирование гидрофобных адсорбентов основано на взаимодействиях, не играющих существенной роли в функционировании других адсорбентов. Поэтому теоретически следует ожидать, что с их помощью можно разделить компоненты смеси, которые ведут себя одинаково, например при ионообменной хроматографии. На практике же использование гидрофобной хроматографии ограниченно, поскольку этим методом не удается достичь четкого разделения фракционируемой смеси. Это обусловлено тем, что при изменении условий величина α изменяется медленно, и это приводит к значительному перекрыванию пиков отдельных компонентов (рис. 4.52). Кроме того, поскольку принципы гидрофобной хроматографии очень сходны с принципами дробного высаливания, в тех случаях, когда последний метод уже использовался, остается очень мало шансов получить хорошее разделение на гидрофобной колонке. Эти пессимистические соображения уравновешиваются некоторыми положительными моментами. Во-первых, емкость гидрофобных ионообменников по отношению к белкам весьма высока и находится в тех же пределах, что и у ионообменников, а именно 10—100 мг/см³. Во-вторых, поскольку адсорбция проводится при вы-

соких концентрациях соли, нет необходимости в смене буфера перед нанесением образца; нужно лишь добавить достаточное количество соли, чтобы обеспечить связывание интересующего нас компонента смеси. Вследствие стабилизирующего эффекта солей белок элюируется из колонки с очень хорошим выходом. Стабилизация плотности элюента позволяет точно поддерживать понижающийся градиент концентрации соли, что обеспечивает оптимальное поведение колонки.

Белки, прочно адсорбирующиеся даже при низких концентрациях солей, обычно плохо растворимы в воде; к ним относятся глобулины, мембраносвязанные и другие белки, осаждающиеся при низких степенях насыщения сульфатом аммония (20—40%). Все они с трудом удаляются с колонки. Гидрофобные взаимодействия можно ослабить: а) снижая температуру, б) добавляя органические растворители, в) включая в среду полиолы, особенно этиленгликоль, г) используя неионные детергенты, д) снижая pH, что в основном ослабляет ионообменные эффекты, обусловленные положительными зарядами, возникающими при образовании изомочевинных связей с матрицей (см. рис. 4.35). Поэтому после раствора с понижающимся градиентом концентрации соли гидрофобную колонку следует промыть раствором с повышающейся концентрацией этиленгликоля на фоне низкого содержания соли. Другой способ заключается в том, что после адсорбции белков, проведенной при комнатной температуре, для градиентной элюции используют постепенное понижение температуры.

Следует отметить, что потенциальные возможности гидрофобных адсорбентов до сих пор еще не реализованы. Несмотря на отсутствие у них хроматографической избирательности в отношении сходных компонентов смеси, гидрофобные адсорбенты могут быть очень полезными при грубом разделении белков на очень ранних стадиях очистки или даже на первой стадии. Если гидрофобную хроматографию использовать в качестве быстрого метода адсорбции «в объеме», то она может заменить в некоторых случаях фракционирование сульфатом аммония, так как при этом исключается центрифугирование и получается более узкая зона, содержащая нужный белок. Это описано в следующем разделе.

«Высаливающая» хроматография

Как отмечалось выше, гидрофобная хроматография и осаждение белков высаливанием — весьма сходные процессы. Их комбинация является естественным развитием методов разделения. Еще до того, как были получены гидрофобные адсорбенты, успешно применялась методика, состоящая в том, что на колон-

ку, уравновешенную сульфатом аммония, наносили суспензию белка, полученного осаждением этой солью, и затем промывали колонку понижающимся градиентом концентрации соли [118]. Использовались нейтральные, инертные, сорбенты, такие, как целлюлоза, сефадекс и позднее агароза [119]. Однако поведение этих материалов при высокой концентрации соли нельзя назвать в строгом смысле «инертным»; по существу, они ведут себя во многом как гидрофобные адсорбенты.

Целлюлоза нерастворима в воде главным образом из-за своего гидрофобного характера. Атомы водорода в остатках глюкозы располагаются на поверхности кристаллов, тогда как гидроксильные группы ориентированы внутрь и образуют водородные связи с соседними молекулами. Но целлюлоза, подвергнутая специальной обработке, содержит значительное число экспонированных гидроксильных групп и может быть успешно использована в качестве «высаливающего» адсорбента [120]. Замещенные ионообменные целлюлозы адсорбируют белки, по-видимому, даже более эффективно, несмотря на то что при высокой концентрации соли ионообменные свойства их, вероятно, подавлены. Белки, связанные с такими целлюлозными матрицами, можно элюировать раствором *с такой же высокой концентрацией соли,* которая используется для их адсорбции, добавив в раствор вещества, ослабляющие водородные связи, — глицерин, сахарозу, мочевину или этанол [120]. Отсюда следует, что в этих условиях водородные связи имеют по меньшей мере столь же важное значение для адсорбции, как и гидрофобные взаимодействия.

Агароза содержит много метиленовых и гидроксильных групп, поскольку она построена из ангидрогалактановых остатков. Благодаря своей амфифильной природе эти матрицы (частично гидрофобные и частично гидрофильные), может быть, даже больше подходят для адсорбции белков при высоких концентрациях соли, чем чисто гидрофобные материалы [121]. Действительно, агароза оказалась наиболее удачным носителем для проведения высаливающей хроматографии. Белки адсорбируются на агарозе при концентрации соли, несколько более низкой, чем концентрация, требуемая для их осаждения из раствора. Поэтому нет необходимости и даже нежелательно предварительно осаждать белки и наносить их на колонку в виде суспензии. Здесь возможны следующие два приема. 1) К белковому раствору добавляют сульфат аммония до концентрации, несколько более низкой, чем нужно для осаждения выделяемого фермента; образовавшийся осадок отделяют центрифугированием и надосадочную жидкость наносят на колонку, уравновешенную раствором сульфата аммония той же концентрации. 2) Агарозу смешивают с образцом (примерно 1 $см^3$ на 20 мг белка) и

медленно добавляют сульфат аммония до тех пор, пока его концентрация (рассчитанная на суммарный объем агарозы и образца) не будет примерно такой, которая нужна, чтобы осадить белок из раствора. Агарозу затем переносят в верхнюю часть не до конца заполненной колонки, подготовленной, как указано выше. В обоих случаях на агарозе сорбируются молекулы белков, а не их агрегированные формы, и ее поверхность (как наружная, так и внутренняя) покрывается слоем белка, составляющим 30 мг/см^3. После промывания колонки исходным буфером начинают градиентную или ступенчатую элюцию раствором с понижающейся концентрацией соли. Этот метод основан на том же принципе, что и гидрофобная хроматография, однако на агарозе, вероятно, не остается адсорбированного белка при низкой концентрации соли. Слабо выраженный гидрофобный характер агарозы компенсируется тем, что на стадии адсорбции используется более крепкий солевой раствор.

Описанный метод получил дальнейшее развитие, и на его основе был разработан прием «аффинной» хроматографии [122], который сводится к тому, что в буферный раствор добавляют лиганд, изменяющий адсорбционные характеристики. Будь то гидрофобные адсорбенты или агароза, принципы аффинной хроматографии остаются теми же, что и в случае использования более специфических адсорбентов (разд. 4.5) или ионообменников (разд. 4.4). Сначала в отсутствие лиганда находят условия, которых еще не вполне достаточно, чтобы вызвать нужный эффект (в данном случае элюцию). Затем добавляют лиганд, что слегка нарушает установившееся равновесие и приводит к ожидаемому эффекту. Важно, чтобы при добавлении лиганда происходило заметное изменение существенного для очистки свойства, в данном случае — гидрофобного взаимодействия. Лиганд должен сохранять способность связываться с ферментом в условиях, существующих в колонке, т. е. при высокой концентрации соли. Примером «аффинного осаждения» может служить очистка некоторых тРНК-аминотрансфераз [122]: связывание крупной молекулы тРНК приводит к заметному снижению адсорбционной способности колонки, что позволяет осуществлять элюирование.

Комплексы протамин — нуклеиновая кислота как адсорбенты

Первая стадия очистки экстрактов, полученных из микроорганизмов и других быстрорастущих клеток, содержащих большие количества нуклеиновых кислот, состоит обычно в осаждении последних протаминсульфатом (см. разд. 2.3). Полученный осадок, как правило, содержит мало других белков, кроме

нуклеопротеинов, и процесс осаждения заключается просто в удалении ненужного материала из экстракта. Однако иногда после осаждения протамином наблюдается значительное снижение активности какого-нибудь фермента, но если осадок экстрагировать подходящим буфером, то удается вновь регенерировать потерянную активность. В таких случаях это явление можно использовать как важный способ очистки. Так, α-кетоглутаратдегидрогеназа из *E. coli* адсорбируется на осадке, содержащем комплекс протамин—нуклеиновая кислота, и экстрагируется из него 0,1 М фосфатным буфером при pH 7 [123]. Недавно свойство дрожжевой фосфофруктокиназы полностью сорбироваться на протаминовом осадке также было использовано для ее очистки [17]. Поскольку эти ферменты функционируют в присутствии нуклеотидов, адсорбция может быть обусловлена взаимодействием экспонированнного нуклеотидсвязывающего участка с нуклеиновой кислотой.

Адсорбенты со смешанной функцией

За десятилетие, прошедшее со времени первого описания биполярных ионообменников [69], они не получили широкого распространения, несмотря на то что описанные свойства этих сорбентов представляются весьма полезными. Связывание сульфаниловой кислоты и аргинина с активированной эпихлоргидрином агарозой (сефарозой 6В) приводит к образованию биполярных заместителей (рис. 4.53). Значение pK_a вторичной аминогруппы в сульфанилсефарозе оказалось равным 7,25, а в

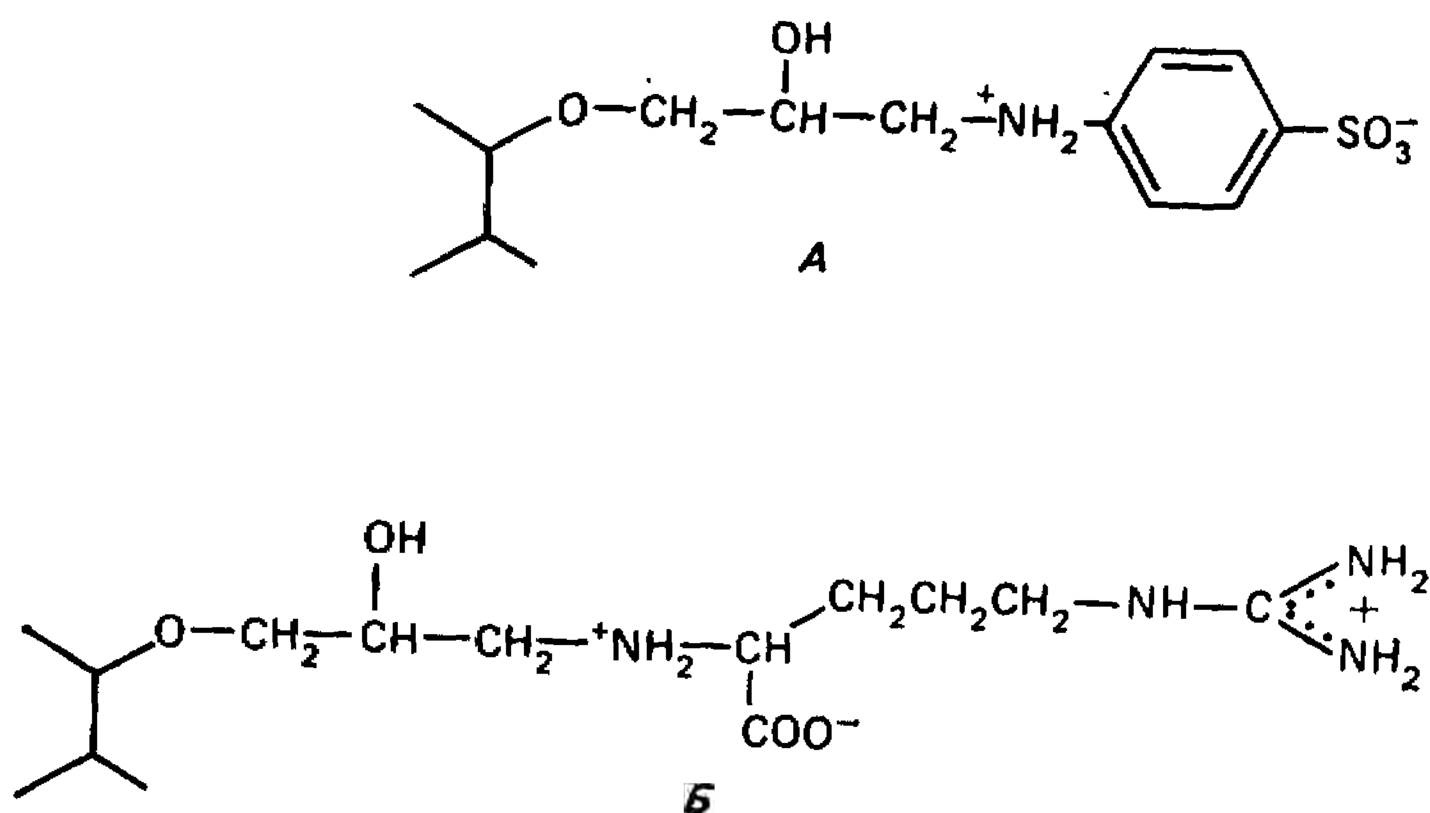


Рис. 4.53. Биполярные «ионообменные» адсорбенты на основе геля агарозы [69]. *А*. Агароза, модифицированная сульфаниловой кислотой. Мало вероятно, чтобы атом азота в остатке сульфаниловой кислоты был протонирован при pH выше 4. *Б*. Аргининагароза.

аргининсефарозе — 8,10; поэтому вещества, формулы которых изображены на рис. 4.53, по-видимому, лучше использовать при значениях pH ниже этих величин pK_a. Было показано, что на адсорбентах со смешанными функциями происходит избирательная адсорбция белков плазмы, причем емкость адсорбентов оказалась столь же высокой, как и у обычных ионообменников. Адсорбент на основе сульфаниловой кислоты обнаруживает также в некоторой степени гидрофобный характер; его можно рассматривать как сильно упрощенный структурный аналог адсорбента, модифицированного красителем (см. разд. 4.6).

Были разработаны и другие сходные адсорбенты со смешанными функциями [64—66]. В этом случае гидрофобные и гидрофильные свойства придавались аффинным лигандам, причем в процессе адсорбции наблюдалась высокая селективность. Однако очень низкая емкость этих сорбентов ограничивает их применение.

Адсорбенты на основе фенилборной кислоты

Для очистки ферментов недавно был предложен адсорбент, представляющий собой агарозу, связанную с фенилборной кислотой. Он функционирует благодаря образованию легко расщепляемой ковалентной связи между остатком иммобилизованной борной кислоты и *цис*-гидроксильными группами растворимых соединений (рис. 4.54). Таким образом, этот адсорбент может служить общим аффинным адсорбентом, избирательно взаимодействующим с гидроксильными группами в *цис*-положе-

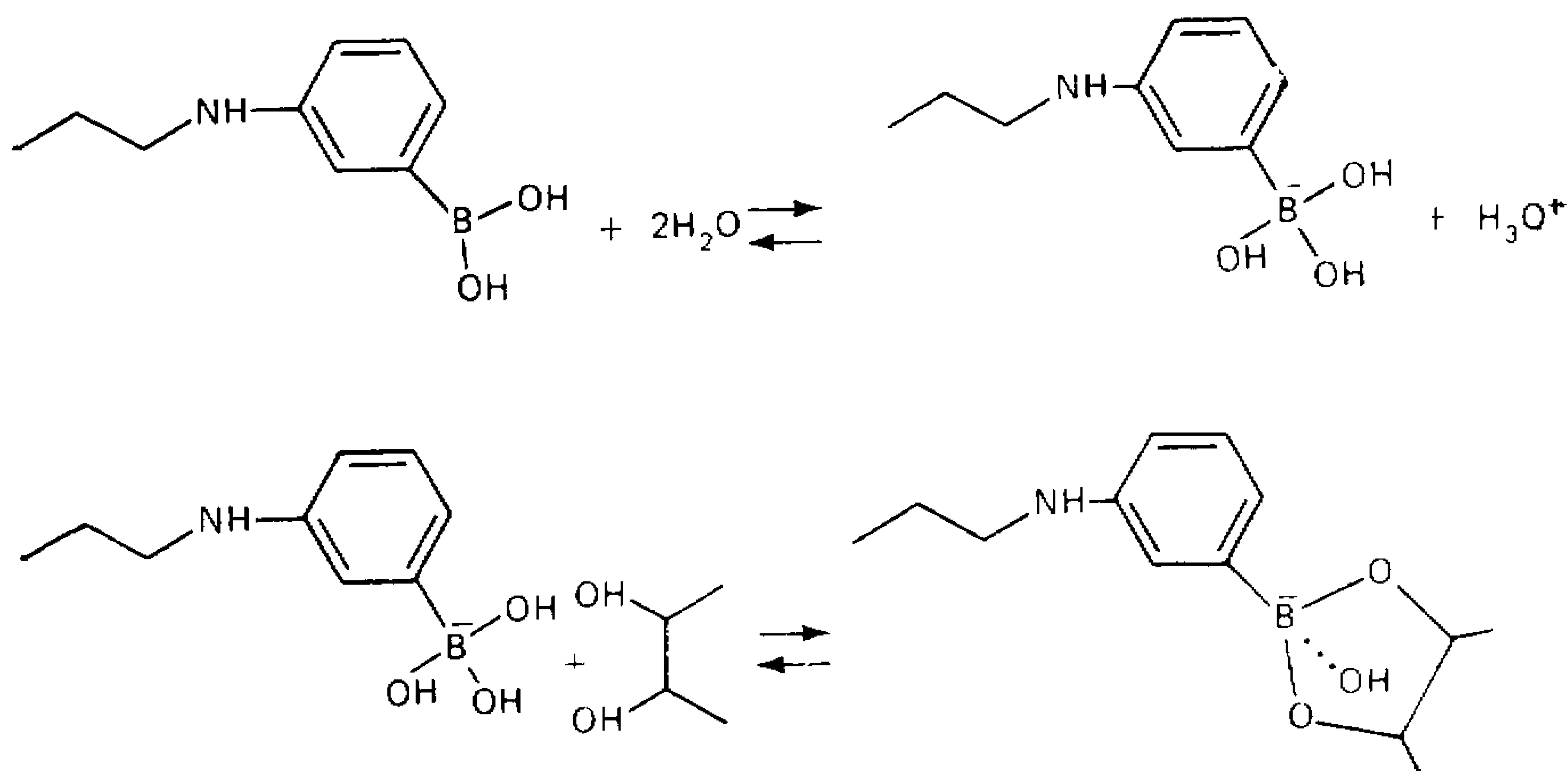


Рис. 4.54. Реакции фенилборной кислоты с 1,2-*цис*-диольными соединениями, подобными тем, которые встречаются в углеводном компоненте гликопротеинов и в рибозном кольце нуклеотидов [124].

нии. Однако белки содержат такие гидроксилы только тогда, когда в их состав входят простетические группы, особенно углеводы. Следовательно, адсорбенты на основе фенилборной кислоты предоставляют альтернативный способ связывания гликопротеинов помимо более традиционного метода с использованием агарозы, модифицированной лектином.

Более интересный способ применения этого адсорбента получил название «хроматография верхом на лиганде» («piggyback chromatography») [124]. В этом случае колонку уравновешивают лигандом, содержащим гидроксильные группы, например сахаром или рибонуклеотидом, таким, как ATP или NAD. При этом лиганд с высокой плотностью, но очень непрочно (обратимо) адсорбируется на колонке [величина m_t в уравнении (4.5) приближается к 10^{-1} М]. После этого образец наносят на колонку, и фермент, связавшись с лигандом, удерживается на ней. Поскольку связь между адсорбентом и лигандом обратима, определенная часть лиганда в каждый момент времени перемещается вниз по колонке и фермент, «сидящий верхом» на лиганде, движется вместе с ним. Перемещение лиганда иногда бывает настолько медленным, что для элюции фермента может потребоваться его избыток (или же другой лиганд).

Так как значение m_t велико, высокое значение α достигается даже в случае систем с низким сродством. Например, если $m_t=3\cdot10^{-2}$ М, $K_P=5\cdot10^{-3}$ М и $p_t=10^{-4}$ М, то $\alpha=0,86$, что характеризует вполне приемлемое удерживание и приводит к высокоспецифическому связыванию белков с выбранным лигандом. К сожалению, наблюдается неспецифическая сорбция за счет фенильного кольца, что может затруднить разделение. Детальное описание этого метода дано в буклете фирмы Amicon [124].

4.9. АДСОРБЦИЯ «В ОБЪЕМЕ»

В некоторых простейших стадиях очистки ферментов используется адсорбция «в объеме», которая заключается в том, что хлопьевидный материал вносят в белковый раствор, часто в исходный экстракт, и белки сорбируются на нем. Для этой цели пригоден любой адсорбент, который можно быстро отделить путем осаждения или фильтрации и затем промыть. При работе с малыми количествами материала центрифугирование более удобно. Главное условие для успешной адсорбции «в объеме» — это то, что коэффициент распределения α адсорбируемых белков должен быть очень близок к единице, а многие другие белки, присутствующие в смеси, должны иметь более низкие величины α. Как видно из рис. 4.55 и табл. 4.10, *концентрация* свободного белка остается постоянной во всем

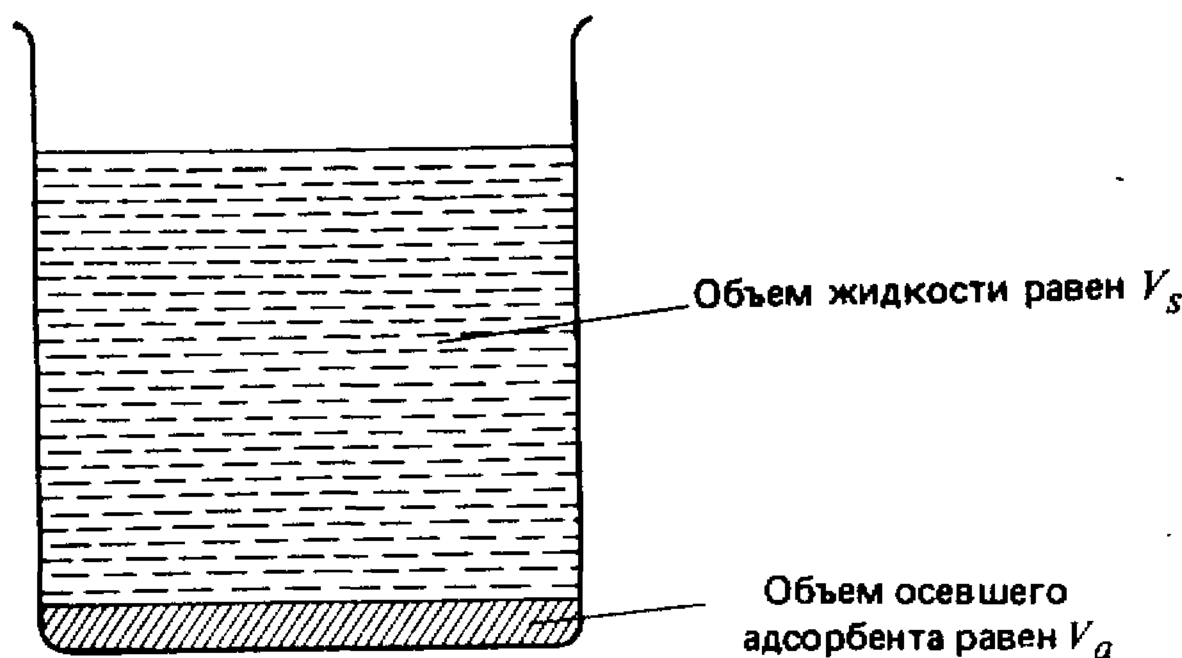


Рис. 4.55. Определение объемов при адсорбции белков «в объеме».

объеме и, следовательно общее *количество* неадсорбированного белка может быть значительным, если α даже ненамного меньше единицы.

Рис. 4.55 позволяет сделать следующие расчеты. Обозначим объем свободной жидкости и объем осевшего адсорбента в двухфазной системе соответственно V_s и V_a. Концентрация свободного белка p в объеме V_a та же, что и в объеме V_s. Количество адсорбированного белка равно $q \cdot V_a$, где q — концентрация адсорбированного белка. Количество несвязанного белка можно выразить как $p(V_a + V_s)$. Коэффициент распределения α определяется как $\alpha = q/(p+q)$. Отсюда концентрация несвязанного белка будет $p = q(1-\alpha)/\alpha$. Следовательно, долю связанного белка f можно представить в следующем виде:

$$f = \frac{qV_a}{p(V_a + V_s) + qV_a} = \frac{V_a\alpha}{V_a + (1-\alpha)V_s}. \qquad (4.11)$$

В табл. 4.10 показано, насколько близким к единице должен быть коэффициент α, чтобы выход по адсорбции был до-

Таблица 4.10. Доля белка (f), адсорбированного при различных условиях адсорбции «в объеме» [из уравнения (4.11)]

V_a/V_s	α	f	V_a/V_s	α	f
0,05	0,9	0,30	0,05	0,98	0,70
0,1	0,9	0,45	0,1	0,98	0,82
0,2	0,9	0,60	0,1	0,98	0,89
0,5	0,9	0,75	0,1	0,99	0,99
0,1	0,95	0,63	0,02	0,998	0,91
0,2	0,95	0,76	0,05	0,998	0,96
0,5	0,95	0,86			

статочно высоким — порядка 80—90%. Большинство адсорбентов должно иметь значения K_p меньше, чем 10^{-6} М, чтобы величина α была 0,98 или выше. При α больше 0,99 можно использовать очень малое количество адсорбента. Если в растворе присутствует в малых количествах только требуемый фермент, значение $V_a/V_s=0,02$ будет достаточно разумным. Однако обычно адсорбенты не столь специфичны — с ними может связываться большое количество других белков, понижая тем самым их эффективную емкость.

Аффинные адсорбенты значительно более селективны, но, как указывалось в разд. 4.6, без заметных неспецифических взаимодействий едва ли можно добиться, чтобы значения K_p были меньше 10^{-6} М. Если аффинный сорбент содержит лиганд, очень прочно связывающийся с ферментом, и неспецифические взаимодействия малы (благодаря использованию гидрофильных «мостиков» или вследствие прямого присоединения лиганда к матрице), то адсорбция фермента на таком сорбенте «в объеме» может дать весьма хорошие результаты. Особенно пригодны для адсорбции «в объеме» иммуноадсорбенты, поскольку они избирательно и прочно связывают антиген. Адсорбенты, модифицированные красителями, также удовлетворяют этим условиям, однако они сравнительно менее специфичны. В данном случае может понадобиться весьма большое количество адсорбента, чтобы адсорбировать весь желаемый фермент. Так, 90% глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (из дрожжей и бактерий) можно адсорбировать из сырого экстракта на сефарозе 3В, модифицированной проционовым красным НЕ, при соотношении $V_a/V_s=0,1$. Как видно из табл. 4.10, величина α равна в этом случае 0,99 или больше.

Иногда возникает необходимость установить, имеет ли адсорбция «в объеме» преимущество по сравнению с колоночной хроматографией. Методы адсорбции «в объеме» дают возможность быстро обработать большие объемы материала, но если значение α не превышает существенно 0,98, потери вещества неизбежны. На колонке можно достичь 100%-ной адсорбции, даже если $\alpha=0,95$, но хроматографические методы более трудоемки и занимают больше времени, и, кроме того, поверхность адсорбента может забиваться при использовании сырых экстрактов. Рассмотрим следующую ситуацию: к 1 л исходного материала добавляют 100 см^3 адсорбента. При этом сорбируется 63% фермента ($\alpha=0,95$, табл. 4.10). Если то же значение α реализуется на колонке и емкость ее (m_t) намного больше, чем присутствующее в образце количество фермента, то при пропускании всего образца через колонку объемом 100 см^3 передний край зоны неадсорбированного белка будет локализован в середине колонки [скорость перемещения=скорость потока×

$\times(1-\alpha)$; пропущенный объем равен 1 л и, следовательно, перемещение=50 см^3]. Промывка колонки еще одной порцией буфера объемом 500 мл не приведет к элюции фермента, так что последующая ступенчатая или градиентная элюция даст прекрасное хроматографическое разделение. Если же объем исходного экстракта увеличить, например, до 20 л, то при использовании колонок могут возникнуть трудности. Вопрос заключается в том, достаточна ли 63%-ная адсорбция при обработке материала в объеме, учитывая, что еще некоторое количество может быть потеряно при промывке. На этот вопрос, по-видимому, следует ответить отрицательно — нужно или несколько повысить значение α, или увеличить количество адсорбента. Добавив к исходному раствору удвоенное количество адсорбента, можно достичь 76%-ного извлечения фермента (табл. 4.10), что, конечно, более приемлемо. Возможно, что разбавление исходного раствора водой и, следовательно, снижение ионной силы вдвое приведет к возрастанию α. При том же количестве (100 см^3) адсорбента, если даже α увеличится с 0,95 до 0,98, извлечение повысится лишь до 70% на стадии адсорбции из-за изменения соотношения объемов (V_a/V_s станет равным 0,05).

Даже в том случае, когда фермент совсем не адсорбируется, обработка исходного раствора путем добавления к нему порции адсорбента может быть чрезвычайно полезной, так как при этом удаляются другие белки. Пример такой обработки приведен в предыдущем разделе. В дрожжевой экстракт добавляли сначала гидроокись цинка, а затем бентонит. Бóльшая часть белкового материала адсорбировалась, а вся фосфоглюкозоизомераза оставалась в растворе [111] (см. табл. 4.9). Существует много других примеров обработки экстрактов адсорбентами; иногда она проводится с целью «осветления» экстракта, но сопровождается также адсорбцией ненужного материала. Даже тогда, когда достигается лишь небольшая степень очистки (например, только 10—20%-ное повышение удельной активности), удаленный белок может оказаться важной примесью, мешающей реализации последующих стадий очистки.

Общие подходы

Простейший метод адсорбции белков «в объеме» заключается в том, что к белковому раствору добавляют адсорбент (уравновешенный подходящим буфером), размешивают суспензию в течение нескольких минут, дают адсорбенту отстояться и затем отфильтровывают его с отсасыванием. Осадок на воронке промывают буфером до тех пор, пока в промывных водах не будет обнаруживаться очень мало белка. Осадок отсасывают досуха, смешивают его с элюирующим буфером (временно прекращая

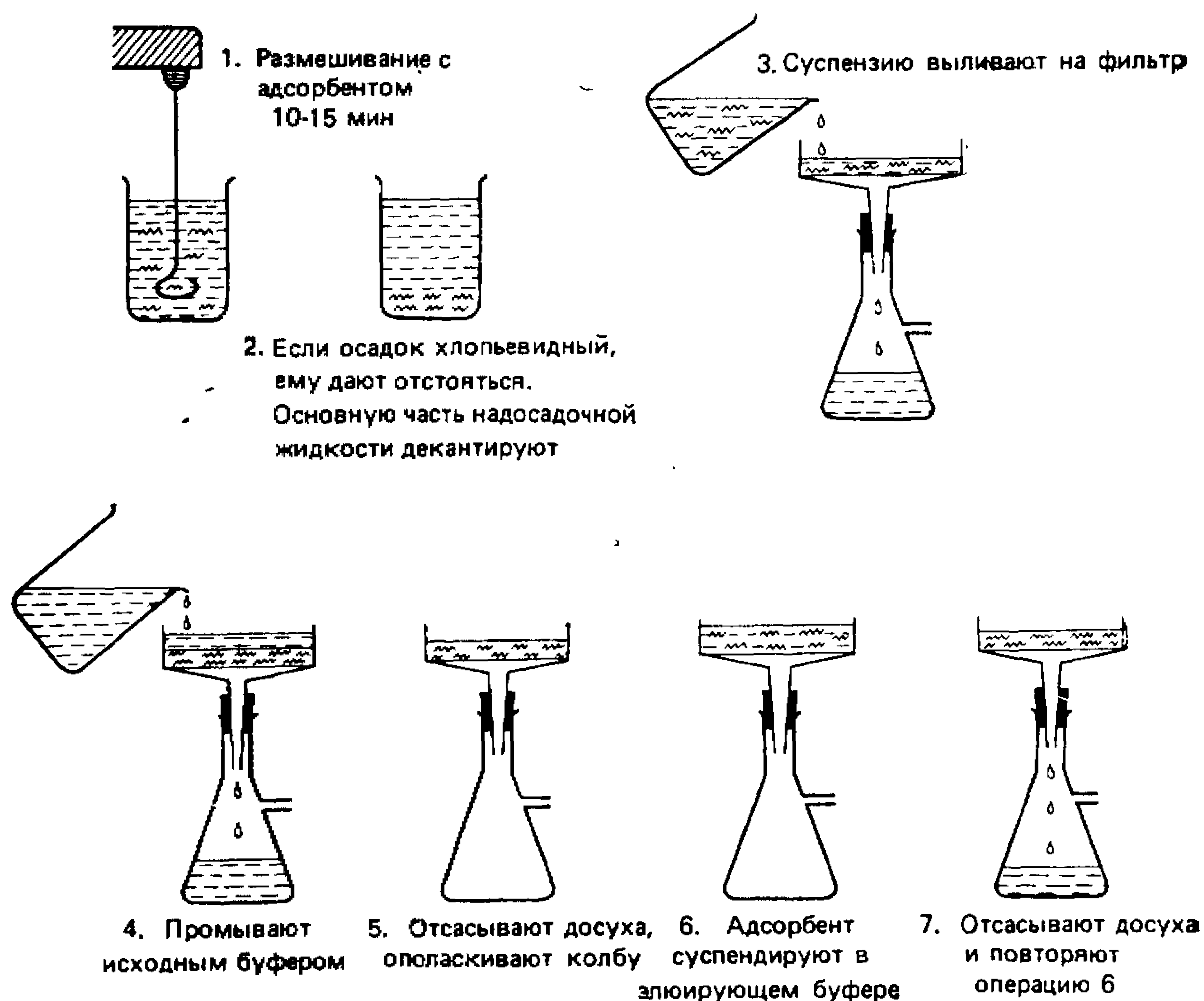


Рис. 4.56. Проведение адсорбции белков «в объеме» и последующей элюции.

отсос) и оставляют на несколько минут. Иногда лучше перенести адсорбент с элюирующим буфером в стакан, чтобы удобнее было размешивать его в течение нескольких минут, а затем суспензию вновь перенести на воронку. Тем временем сборник фильтрата следует тщательно вымыть и высушить перед тем, как начать отсасывание элюирующего буфера. Эту процедуру затем повторяют и в конце, не размешивая осадок, пропускают дополнительный объем буфера, чтобы обеспечить полную отмывку всего десорбированного фермента. Объем каждой порции элюирующего буфера должен быть равен 1—2 объемам осадка. На рис. 4.56 представлена схема этого процесса.

Иногда приходится усложнять описанную процедуру для улучшения результатов очистки. Например, в смеси могут присутствовать белки, адсорбирующиеся прочнее, чем требуемый фермент, так что последний совсем не связывается с первой порцией внесенного адсорбента. В этом случае следует удалить первые порции адсорбента, прежде чем добавлять новые порции, адсорбирующие фермент (рис. 4.57). Можно провести

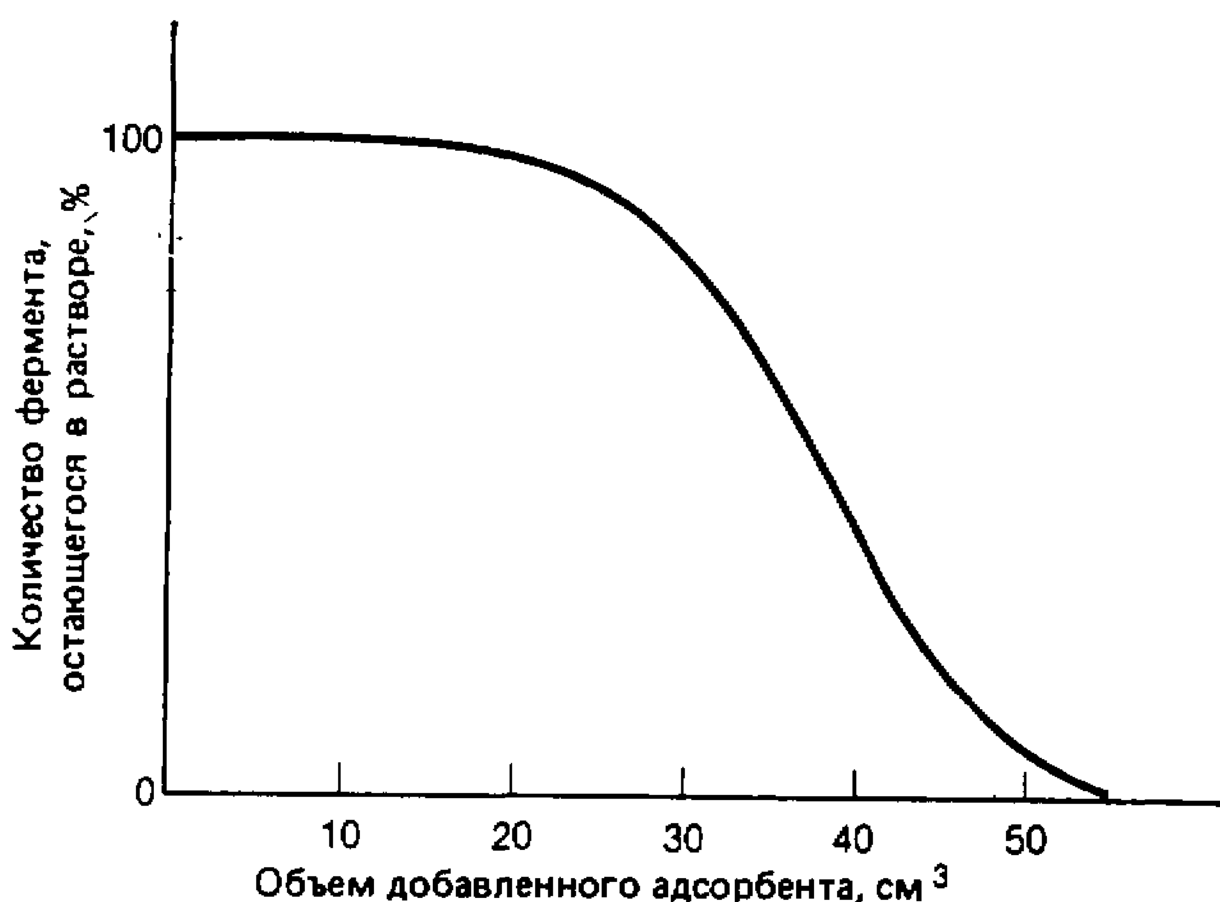


Рис. 4.57. Измерение ферментативной активности, остающейся в растворе после последовательного добавления порций адсорбента, позволяет проводить адсорбцию в оптимальных условиях. В этом примере сначала добавляют 20 см^3 адсорбента, который затем удаляют. После этого добавляют еще 30 см^3 адсорбента для связывания ферментного белка.

пробные опыты на небольших количествах материала, чтобы найти оптимальные объемы порций адсорбента.

Элюцию тоже можно осуществлять ступенчато, чтобы ненужный материал выходил в первых порциях элюата, и лишь потом добавлять буфер, элюирующий требуемый фермент. Пробные опыты опять-таки позволяют найти оптимальные условия (рис. 4.58).

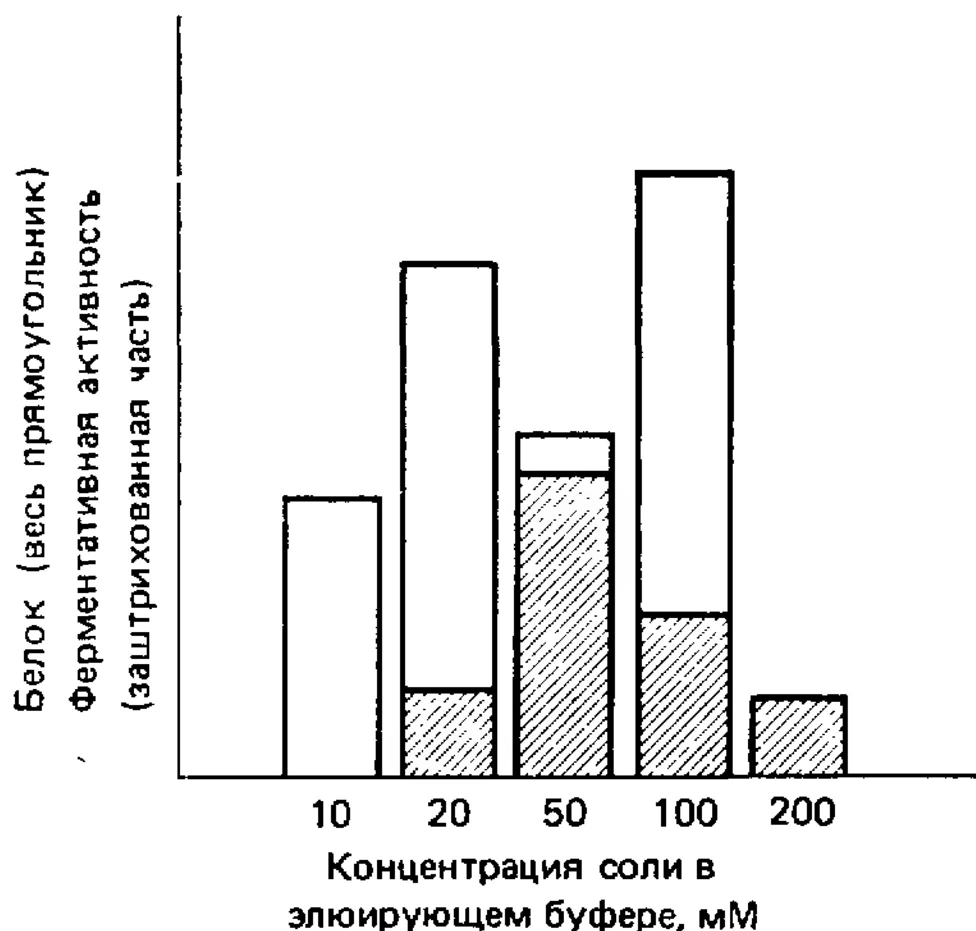


Рис. 4.58. Ступенчатая элюция, проводимая с целью найти оптимальный способ извлечения фермента. В этом примере бо́льшая часть фермента элюируется при концентрации соли выше 20 мМ. Вероятно, наилучшие результаты будут получены, если осадок 1) промыть 20 мМ раствором соли для удаления примесных белков и 2) дважды промыть его 50—60 мМ раствором соли, чтобы получить бо́льшую часть фермента, не слишком сильно загрязненного неспецифическими белками.

К типичным материалам, используемым для адсорбции белков «в объеме», относятся гель фосфата кальция, ионообменники (особенно фосфоцеллюлоза), аффинные адсорбенты, адсорбенты, модифицированные красителями, гидрофобные адсорбенты и иммуноадсорбенты.

В гл. 2 уже обсуждались способы отделения белков от других нежелательных веществ, таких, как камеди и другие углеводы, присутствующие в капсулах микроорганизмов, с помощью гидрофобной или высаливающей адсорбции.

Вследствие того что адсорбция белков «в объеме» — это быстрый метод, позволяющий обрабатывать большие количества материала, его следует иметь в виду при любых операциях по выделению веществ с применением адсорбентов. Сейчас производится столько разных типов адсорбентов, например адсорбенты, модифицированные красителями, что вероятность существования адсорбента с подходящими для данного фермента характеристиками весьма велика. Если такой адсорбент применять на стадии неочищенного экстракта, это сэкономит много времени и избавит от необходимости приобретать оборудование для крупномасштабной работы.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Amicon Corporation publications (1980). Dye-ligand chromatography: Applications, method, theory of Mätrex gel media, Lexington, Mass.

Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F. (eds.) (1982). Affinity chromatography and related techniques, Elsevier, Amsterdam.

Jackoby W. B. (ed.) (1974). Affinity techniques: Enzyme purification, part B. In: Methods in Enzymology, vol. 34, Academic Press, New York.

Lowe C. R. (1979). An introduction to affinity chromatography. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work T. S. and Burdon R. H., eds.), vol. 7, Part II, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Lowe C. R., Dean P. D. G. (1974). Affinity chromatography, Wiley, London.

Peterson E. A. (1970). Cellulosic ion exchangers (Work T. S. and Burdon R. H., eds.), vol. 2, Part II, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Pharmacia Fine Chemicals AB publications (1979). Affinity chromatography: Principles and methods, Uppsala.

Pharmacia Fine Chemicals AB publications (1980). Ion exchange chromatography: Principles and methods, Uppsala.

Turková J. (1978). Affinity chromatography, Elsevier, Amsterdam.

РАЗДЕЛЕНИЕ В РАСТВОРЕ

Методы, описанные в гл. 3 и 4, связаны с фазовыми изменениями. Белки переходят из жидкой фазы (т. е. из раствора) в твердую (в осадок или на поверхность адсорбента) и обратно. Не все белки выдерживают жесткие условия, характерные для этих методов, существуют более мягкие способы разделения белков, которые при этом находятся в растворе в течение всей процедуры. Один из них — гель-фильтрация — относится к важнейшим методам, применяемым для очистки ферментов и других белков, и будет рассмотрен детально.

Другие методы, сгруппированные под общим названием «электрофоретические методы», распространены не столь широко по причинам, которые будут рассмотрены в разд. 5.2 и 5.3. Третий, мало используемый прием разделения веществ в растворе — фазовое распределение, — при котором белки могут перемещаться из одной жидкой фазы в другую, описан в разд. 5.4. В качестве общего метода разделение веществ в растворе играет важную роль как в научных исследованиях, так и в промышленной очистке ферментов и других белков.

5.1. ГЕЛЬ-ФИЛЬТРАЦИЯ

Для этого метода было предложено несколько названий, в том числе и такие, как *гель-проникающая хроматография* и *молекулярно-ситовая хроматография*. Однако термин гель-фильтрация в настоящее время настолько широко распространен и общепризнан, что будет использоваться и в данной книге. Вместе с тем следует отметить, что это название неудачно, так как используемый материал не обязательно должен представлять собой истинный гель, а происходящий процесс не является на самом деле фильтрацией.

Выпускаемые фирмой Pharmacia chemicals сефадексы — гели, полученные на основе декстрана, — впервые были введены в практику Поратом и Флодином [125] и вскоре получили общее признание в качестве материалов для гель-фильтрации, с помощью которых можно быстро разделить макромолекулы в со-



Рис. 5.1. Двумерное изображение пор в гель-фильтрующем материале, показывающее доступность различных участков геля для молекул разных размеров.

ответствии с их размерами. Эти поперечно-сшитые декстрановые шарики очень скоро нашли широкое применение как для разделения белков, так и для определения их молекулярных масс [126, 127]. С тех пор дальнейшее развитие метода и расширение сферы его применения в результате усовершенствования гелей позволили ускорить время операций и охватить больший диапазон молекулярных масс биополимеров. Основные принципы метода просты. Гель состоит из открытой поперечно-сшитой трехмерной молекулярной сетки, сформированной в виде шариков (гранул) для удобства наполнения колонок.

Поры внутри гранул имеют такие размеры, что некоторые из них недоступны для крупных молекул, тогда как более мелкие молекулы могут проникать во все поры. Недоступность пор обусловлена тем, что они или слишком узки для молекул, или если даже достаточно широки, то не имеют каналов, выходящих на поверхность гранул, — это показано на двумерной схеме, приведенной на рис. 5.1. Двумерное изображение не отражает истинной картины, поскольку поперечные сшивки, которые, казалось бы, препятствуют проникновению молекул внутрь частиц, могут быть обойдены при перемещении молекул в направлениях, выходящих из плоскости рисунка.

В настоящее время принято считать оптимальными такие условия потока, при которых все доступные поры заполнены

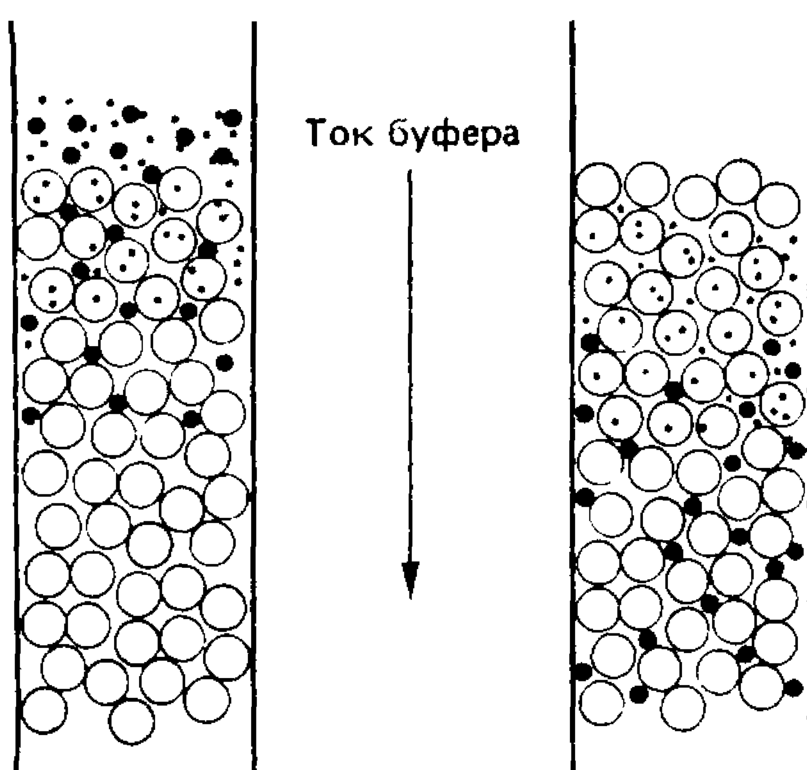


Рис. 5.2. Простая диаграмма, иллюстрирующая принципы гель-фильтрации для разделения на колонке молекул разных размеров. Крупные молекулы исключаются из большей части доступного объема колонки и поэтому быстро движутся впереди «фронта растворителя».

молекулами проходящего по колонке белка. Таким образом, здесь действуют равновесные, а не кинетические эффекты. Материалы различных типов имеют какую-то определенную долю пор, доступных для макромолекул данного размера с вероятностью от 0 до 100%. Невозможно изготовить материал с порами только одного размера, что позволило бы получить очень узкий диапазон фракционирования. В самых лучших материалах для гель-фильтрации поры имеют размеры, обеспечивающие 90%-ное исключение макромолекул, которые по своим размерам (объему) в 5—6 раз превосходят макромолекулы, исключаемые лишь из 10% объема гранул. Это означает, что у 80% пор ширина, по-видимому, примерно в два раза больше линейных размеров сферических частиц.

Схемы, объясняющие теорию гель-фильтрации, достаточно ясны, но часто дают ложное представление о размерах молекул и гранул геля. Так, на рис. 5.2 схематически изображены принципы метода, но истинные соотношения размеров молекул и гранул геля лучше переданы на рис. 5.3. Гранулы носителя, величина которых превышает линейные размеры молекул в 10^3—10^4 раз, имеют в молекулярном масштабе ворсистую поверхность.

Поведение молекул в колонке при гель-фильтрации может быть описано несколькими способами. Его можно выразить следующим уравнением:

$$K_{\text{ср}} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0),$$

где V_t — общий объем колонки, V_0 — свободный объем (между гранулами геля), V_e — объем элюции рассматриваемой молекулы и $K_{\text{ср}}$ — коэффициент, определяющий долю пор, которую может занимать эта молекула. Альтернативный подход состоит в том, что между объемом элюции неизвестного белка и объемом

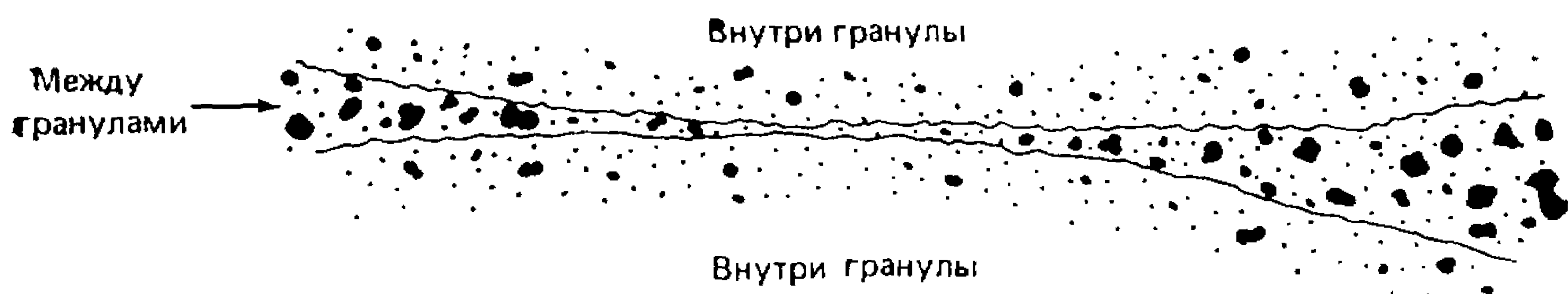


Рис. 5.3. Масштабная диаграмма, иллюстрирующая относительные размеры молекул (зачернены) и гранул, используемых в гель-фильтрации.

элюции ряда молекул известных размеров устанавливают соотношение, из которого путем простой экстраполяции определяют размер неизвестной молекулы. Теоретически объем элюции связан не с размером молекулы, а с ее стоксовским радиусом. Стоксовский радиус описывает сферу с гидродинамическим поведением, эквивалентным поведению данной конкретной частицы неправильной формы. Поэтому, допуская, что по своей форме неизвестные и калибровочные белки сходны, можно калибровать колонку по молекулярной массе.

Для очистки белков точное определение объема элюции не столь существенно при условии, что балластные белки хорошо отделяются. Обычно желательно, чтобы нужный белок элюировался в диапазоне, лежащем между одной третью и двумя третями общего объема колонки, так как именно в этой области достигается наивысшее разрешение. Однако для некоторых специальных целей приходится выбирать другую область объемов элюции (см. ниже).

Сефадекс (поперечно-сшитый декстран), который используется уже более 20 лет, будет и дальше использоваться, особенно при работе в промышленных масштабах, когда необходимо учитывать быстроту, стоимость и удобство выполнения операций. Поперечно-сшитые полиакриламидные гранулы (биогели) также находят широкое применение и имеют сходные с сефадексом интервалы фракционирования. Для очень больших молекул белков, вплоть до агрегатов, приближающихся по размерам к вирусам, наиболее предпочтительны агарозные гели. Попытки ввести в белковую химию материалы на основе стекла с контролируемым размером пор не увенчались успехом из-за сорбции белка на его поверхности. Хотя эти трудности можно было бы преодолеть, преимущества стеклянных гранул, обусловленные их жесткостью, в значительной степени утратили свою ценность вследствие появления новых, более совершенных материалов. Основная проблема, связанная с использованием сефадекса и полиакриламида, заключается в мягкости их гранул; даже очень слабое давление, в том числе осмотическое давление, возникающее в колонке во время хроматографиче-

ского разделения, вызывает деформацию гранул, приводит к неравномерной упаковке материала и в конечном счете служит причиной плохих характеристик потока. Всех этих недостатков в основном лишены декстраны, содержащие дополнительные поперечные сшивки, образованные акриламидом. Этот материал, называемый сефакрилом (Pharmacia), дает более жесткие гранулы, с которыми можно оперировать при повышенном давлении и, следовательно, при более высокой скорости потока. Ультрагели (LKB) представляют собой агарозные гели с вкрапленными в них цепями акриламидного полимера, что придает им бóльшую жесткость и меньшую пористость по сравнению с чистой агарозой. Они пригодны для разделения большинства белков и имеют сходные с сефакрилами S-200 и S-300 интервалы фракционирования. Агарозные гели, предназначенные для разделения очень крупных молекул, выпускают несколько фирм-изготовителей. Фирма Pharmacia предлагает наиболее жесткие поперечно-сшитые агарозы, такие, как CL-сефарозы, но даже они, вероятно, будут вытеснены новой продукцией той же фирмы — сефакрилами S-400, S-500 и S-1000. Список имеющихся в продаже материалов для гель-фильтрации приведен в табл. 5.1.

Здесь необходимо указать, что не все эти материалы полностью инертны. Отмечена сорбция отдельных белков в присутствии некоторых буферных растворов (этим можно воспользоваться как приемом для разделения белков). Частичная сорбция замедляет элюцию, и поэтому белок ведет себя так, как если бы его молекулы имели меньшие размеры, чем это есть на самом деле.

Иногда сорбция носит ионообменный характер, и в таком случае ее можно избежать, применив буферные растворы с высокой ионной силой. Сорбция может быть также обусловлена гидрофобными взаимодействиями, и тогда высокая ионная сила будет только помехой. Сефакрилы, в которых поперечные сшивки образованы алифатическими цепями, особенно склонны проявлять сорбционные свойства при высоких концентрациях солей и низких значениях pH. Поэтому фирмы-изготовители рекомендуют использовать буферные растворы с значениями pH, близкими к нейтральному.

При таком огромном выборе разнообразных материалов начинающий нуждается в совете относительно того, что покупать. Если есть уверенность, что интересующий исследователя фермент не имеет необычно низкой (<15 000) или необычно высокой (>10^6) молекулярной массы, то можно обойтись двумя-тремя видами материалов. Так как поперечно-сшитые декстраны или агарозные гели превосходны *практически* во всех отношениях, то достаточно будет либо двух сефакрилов — S-200 и

Таблица 5.1. Среды для гель-фильтрации

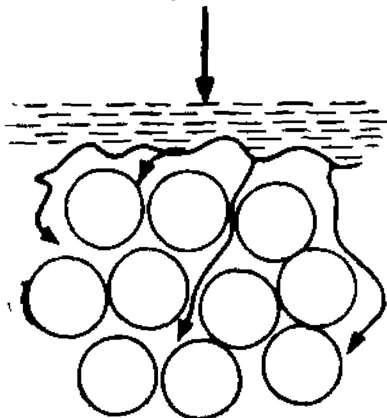
Фирма и название геля	Код геля	Тип геля	Используемый интервал фракционирования для глобулярных молекул (мол. массы)
Bio-Rad Биогели	P-2*	Полиакриламид	100—1800
	P-4*	»	800—4000
	P-6*	»	1000—6000
	P-10*	»	1500—20 000
	P-30*	»	2500—40 000
	P-60	»	3000—60 000
	P-100	»	5000—100 000
	P-150	»	15 000—150 000
	P-200	»	30 000—200 000
	P-300	»	60 000—400 000
	A-0,5 m	Агароза	$1000—0,5\cdot10^6$
	A-1,5 m	»	$2000—1,5\cdot10^6$
	A-5,0 m	»	$4000—5\cdot10^6$
	A-15 m*	»	$60\,000—15\cdot10^6$
	A-50 m*	»	$200\,000—50\cdot10^6$
	A-150 m*	»	$1\cdot10^6—150\cdot10^6$
LKB Ультрагели	AcA22	Агароза/полиакриламид	$60\,000—1\cdot10^6$
	AcA34	То же	20 000—400 000
	AcA44	» »	12 000—1 300 000
	AcA54	» »	6 000—70 000
LKB Агарозы	A2*	Агароза	$120\,000—20\cdot10^6$
	A4*	»	$55\,000—9\cdot10^6$
	A6*	»	$25\,000—2,4\cdot10^6$
Pharmacia Сефадексы	G-10*	Декстран	50—700
	G-15*	»	50—1500
	G-25*	»	1000—5000
	G-50	»	1500—30 000
	G-75	»	3000—70 000
	G-100	»	4000—150 000
	G-150	»	5000—300 000
	G-200	»	5000—600 000
Pharmacia Сефарозы	6B	Агароза	$10\,000—4\cdot10^6$
	4B	»	$60\,000—20\cdot10^6$
	2B*	»	$70\,000—40\cdot10^6$
	CL-6B	Поперечно-сшитая агароза	$10\,000—4\cdot10^6$
	CL-4B	То же	$60\,000—20\cdot10^6$
	CL-2B*	» »	$70\,000—40\cdot10^6$
Pharmacia Сефакрилы	S-200	Декстран/бисакриламид	5000—300 000
	S-300	То же	10 000—800 000
	S-400	» »	$20\,000—2\cdot10^6$
	S-500	» »	Мультиферментные комплексы с мол. массой $>10^6$
	S-1000*	» »	

* Эти материалы не идеально подходят для фракционирования белков.

S-300,— либо двух или трех ультрагелей — АсА22—АсА34 и(или) АсА44. Для белков небольших размеров одинаково пригодны сефадекс G-75 (предпочтителен «тонкий»), ультрагель АсА54 и биогель Р-60. Для крупных белков лучше применять агарозные гели, такие, как сефароза 4В или CL-4B, биогель А-5,0m, ультрагели А4 или А6, а также недавно появившиеся сефакрилы S-400, S-500 и S-1000. Хотя последние и охватывают область, которая включает большинство «типичных» белков с мол. массами 50 000—500 000, они по своей разрешающей способности значительно уступают другим материалам с тем же интервалом фракционирования из-за того, что кажущиеся размеры их пор имеют относительно большой разброс. Это объясняется тем, что крупным порам присуща бо́льшая эластичность по сравнению с мелкими порами более «сшитых» гелей.

Независимо от величины и формы частиц материала, используемого при гель-фильтрации, определенные его параметры остаются постоянными. Для сферических гранул V_0 всегда составляет от 30 до 35% общего объема колонки V_t в зависимости от плотности упаковки материала. Поэтому полезный диапазон объемов элюции для разделения белков лежит в пределах примерно 80% оставшегося объема ($V_t—V_0$), т. е. составляет около 55% V_t. Общий объем, доступный для жидкости, несколько меньше, чем общий объем колонки, так как твердый материал гелевой матрицы вместе с прочно связанной водой занимает некоторый конечный объем. Для колонки с общим объемом 100 см^3 можно ожидать разделения белков в диапазоне объемов элюции 35—90 мл, причем наилучшее разрешение между пиками белков с различными молекулярными массами будет достигнуто при выходе из колонки 60 мл элюата. Фактическое разрешение зависит не только от указанных выше параметров, но и от степени диффузии и отклонений от идеального поведения белков в колонке. Белки имеют относительно низкие коэффициенты диффузии, однако на практике они диффундируют значительно быстрее, чем можно было бы ожидать исходя из теоретических соображений.

В идеальных условиях белковый фронт должен двигаться только благодаря молекулярной диффузии. В эксперименте же даже при использовании колонок, упакованных по всем правилам, возникают два осложняющих обстоятельства. Во-первых, вследствие гравитационной неустойчивости более плотный раствор, движущийся за фронтом белка, оказывается впереди теоретической границы (рис. 5.4). Во-вторых, турбулентность потока, возникающая, когда жидкость продавливается через узкое пространство между гранулами в более широкие пустоты, вызывает дополнительную диффузию. Рис. 5.5 иллюстрирует образование турбулентного потока между гранулами. Гравитаци-



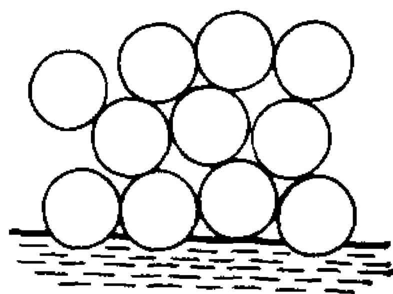


Рис. 5.4. Гравитационные эффекты на границе между буфером и образцом при нанесении образца на гель-фильтрующую колонку [29]. *А*. Плотный раствор образца движется вниз между гранулами, создавая диффузный фронт. *Б*. Плотный раствор образца, нанесенный снизу в восходящем токе жидкости, сохраняет резкий фронт.

онная неустойчивость на переднем крае белковой зоны может быть устранена, если поток элюента направить вверх против сил гравитации, однако при этом нарушится гравитационная устойчивость на задней границе белковой зоны. Полностью эту проблему можно решить только при отсутствии гравитации. С турбулентностью нельзя бороться, не уменьшая скорости потока, но это лишь частично снимает проблему. При значительном уменьшении скорости потока не только недопустимо снижается скорость разделения, но и возрастают эффекты молекулярной диффузии, которые могут превзойти эффекты турбулентности.

Оба этих отклонения от идеального поведения можно сделать менее значительными, если использовать более мелкие гранулы, что приводит к уменьшению расстояний, в пределах которых происходят отклонения. Поэтому более «тонкие» фрак-

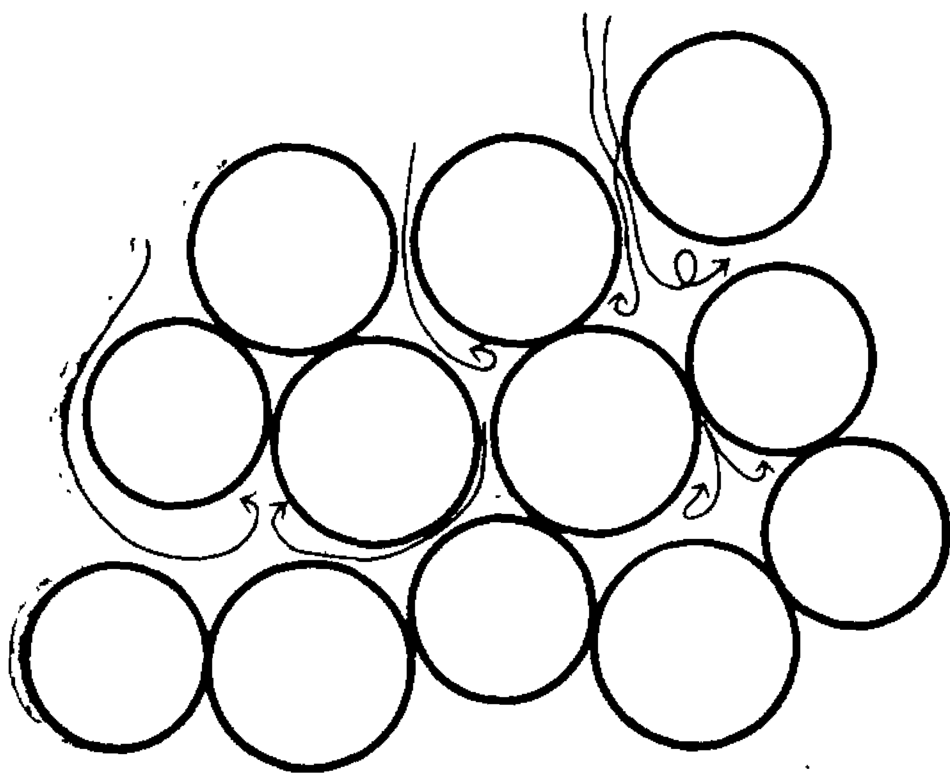


Рис. 5.5. Турбулентный поток при гель-фильтрации приводит к большему размыванию белковых зон, чем только одна диффузия.

ции гранул будут давать лучшее разрешение. Кроме того, использование более мелких гранул означает, что равновесие между их наружным и внутренним объемами будет устанавливаться быстрее, так как расстояния, на которые должны диффундировать молекулы, уменьшаются, и поэтому можно использовать достаточно большие скорости потока без нарушения условий равновесия. К сожалению, чем мельче гранулы, тем выше должно быть давление, чтобы преодолеть сопротивление потоку, что в случае нежестких гранул приводит к их разрушению и закупорке колонки.

В последнее время разработка новых материалов и методов с целью добиться хорошего разрешения идет в двух направлениях. С одной стороны, увеличение жесткости гранул позволяет использовать частицы меньших размеров (например, сефакрил S-200, 40—105 мкм вместо сефадекса G-150, 120—140 мкм) и достигать значительно больших скоростей потока вплоть до предельных, при которых за время прохождения белка по колонке равновесие не успевает установиться. Еще более мелкие гранулы требуют более высоких давлений, которых трудно достичь при рутинной работе. С другой стороны, развитие жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД) дает возможность использовать очень мелкие частицы (например, 5—10 мкм) обычно на основе силикатов, что обеспечивает высокое разрешение за очень короткое время. Однако ЖХВД — это преимущественно аналитический метод. Поэтому для разделения образца, количество которого превышает несколько миллиграммов, колонка необходимых размеров потребует снижения давления. По-видимому, эти два подхода дадут нечто среднее — жидкостную хроматографию при умеренном давлении с использованием очень тонких гранул и не слишком больших скоростей потока.

Выпущенные фирмой LKB новые «голубые колонки» предназначались для использования их при высоком давлении, однако было найдено (см. брошюры фирмы LKB), что низкие давления в сочетании с медленными скоростями потока дают значительно лучшее разделение. Главное достоинство этого материала, по-видимому, заключается в том, что он характеризуется очень широким интервалом фракционирования. В заданном диапазоне молекулярных масс разрешение лишь немногим лучше, чем то, которое достигается с помощью ультрагеля или сефакрила, имеющих более узкий интервал фракционирования. Вместе с тем существующие колонки для хроматографии белков с помощью ЖХВД могут быть использованы для разделения нескольких миллиграммов и дают превосходные результаты на заключительных стадиях очистки белков, когда белок составляет лишь небольшую долю количества исходного материала.

Общие методические вопросы

Для начинающего исследователя гель-фильтрация открывает значительно меньше возможностей, чем ионообменная хроматография. До известного предела используемый буфер *не должен* влиять на достигаемую степень разрешения и единственная важная переменная — это тип материала, т. е. интервал эффективного фракционирования, для которого предназначен данный материал. Предположим, что в распоряжении исследователя имеются два-три поперечно-сшитых декстрановых или агарозных геля (сефакрил, ультрагель), с которыми легко работать, и сразу же возникает вопрос — какой гель выбрать и каковы должны быть размеры колонки. Образец наносится в небольшом объеме, поскольку объем каждого белкового компонента будет увеличиваться из-за обсуждавшихся выше эффектов, связанных с диффузией и неидеальностью потока. Так как эффективный объем фракционирования составляет приблизительно половину объема колонки, четкость разделения обусловлена тем, что образец наносится в малом объеме, который не должен превышать 3% общего объема колонки. Если объем еще меньше (вплоть до 1% общего объема колонки), то разделение получается несколько лучше. При объемах ниже 1% диффузия и

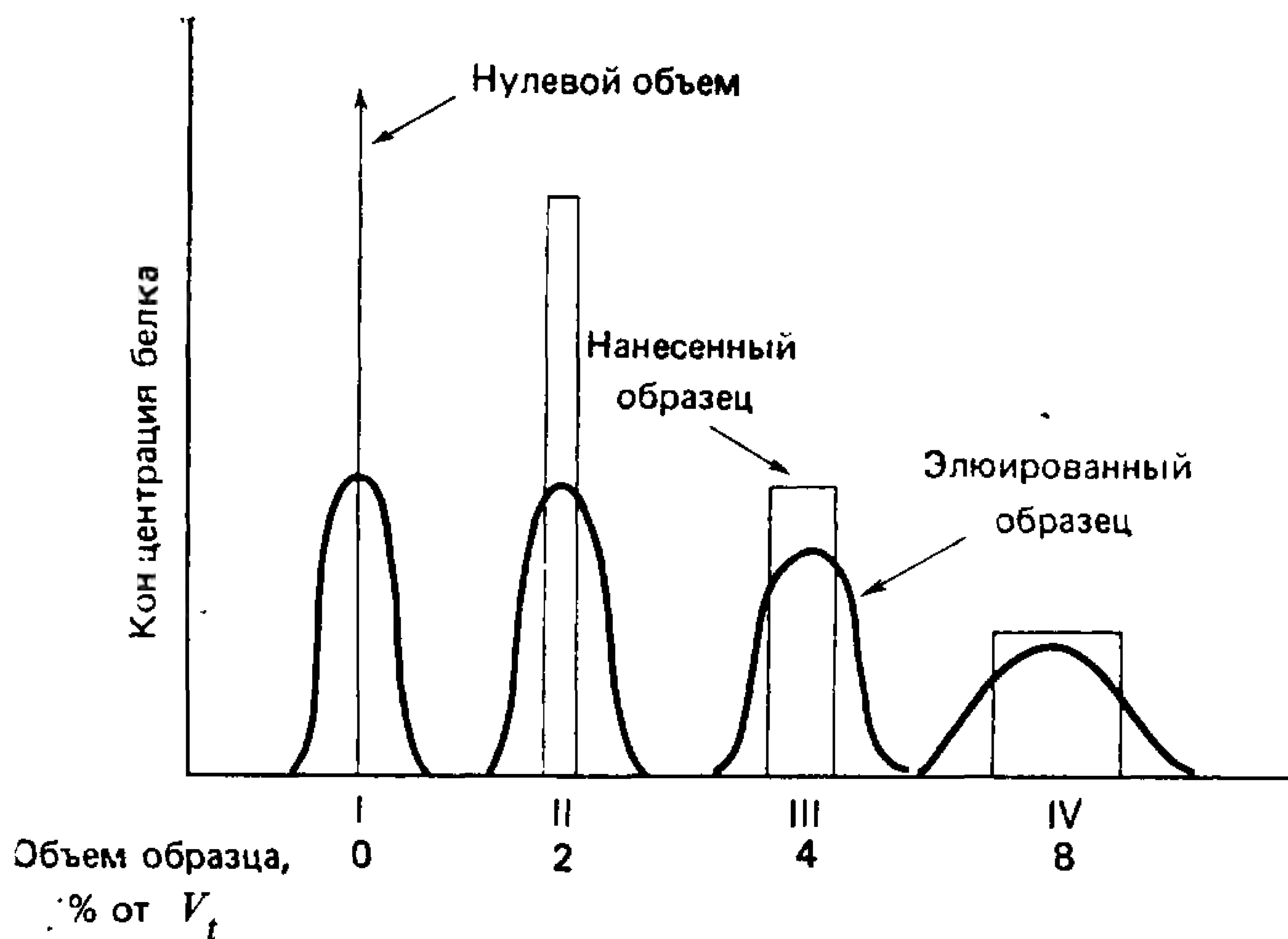


Рис. 5.6. Влияние объема образца на профиль элюции с гель-фильтрующей колонки [29]. Несмотря на то что теоретический нулевой объем соответствует пику I, вследствие диффузии пик белка размывается до объема, близкого к II. В случае III объем образца больше идеального, в результате чего общий объем элюции увеличивается. В случае IV объем образца слишком велик и разделение молекул возможно, только если их размеры различаются не менее чем в четыре раза.

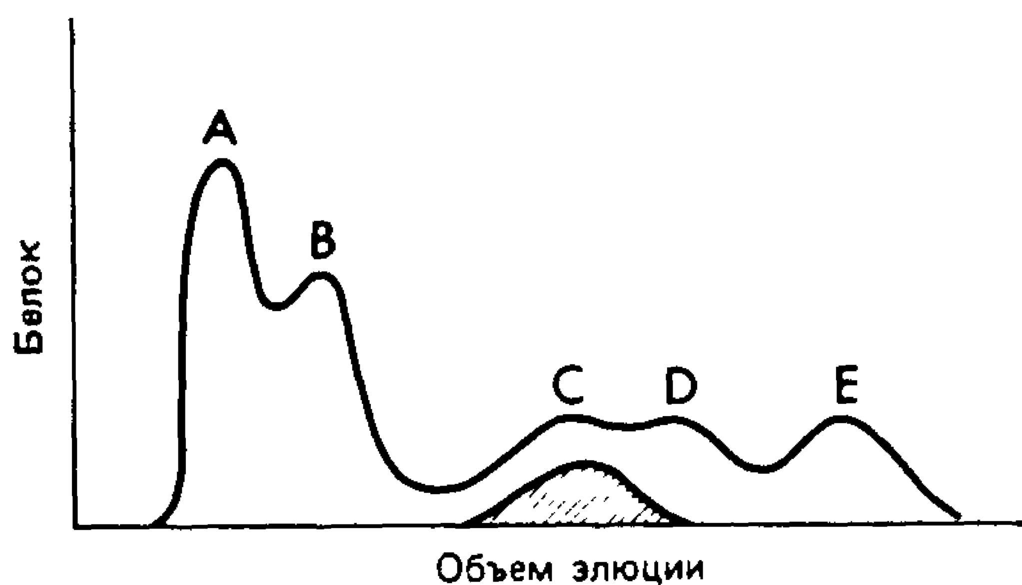


Рис. 5.7. Идеальное разделение пяти белков на гель-фильтрующей колонке [29]. Каждый из этих белков по массе отличается от следующего за ним белка в два раза. На колонку нанесено одинаковое количество каждого белка. Высота пиков снижается из-за большей диффузии более мелких молекул.

неидеальность потока вызывают почти одинаковое размывание пика независимо от объема образца (рис. 5.6).

При элюции 90% каждого компонента обычно выходит в объеме, составляющем 8—10% общего объема колонки, причем размывание пиков зависит в некоторой степени от положения пика элюции. Первые фракции, содержащие самые крупные молекулы, быстрее проходят через колонку и поэтому в меньшей степени подвержены эффектам турбулентности. Следовательно, размывание пика будет тем меньше, чем раньше выходит фракция. Кроме того, молекулы меньших размеров имеют более высокий коэффициент диффузии, что приводит к дополнительному размыванию. Идеализированный профиль элюции, отражающий эту ситуацию, показан на рис. 5.7. Если молекулы нужного фермента имеют небольшие размеры, то его пик будет в большей степени размываться при элюции и с большей вероятностью будет загрязнен белками сходных размеров. Если же фермент элюируется вначале, то пик будет острее, но при наличии большого количества высокомолекулярных примесных белков вполне вероятно, что они будут перекрываться с фракцией фермента (рис. 5.8). Таким образом, интервал фракционирования следует выбирать, принимая во внимание как размеры основных загрязняющих молекул, так и величину молекулы выделяемого фермента.

Важное значение имеют размеры колонки, в том числе ее общий объем, а также соотношение длины и диаметра. В идеальных условиях последний параметр не должен был бы играть существенной роли. Действительно, толстая и короткая колонка имеет то преимущество, что она позволяет достичь



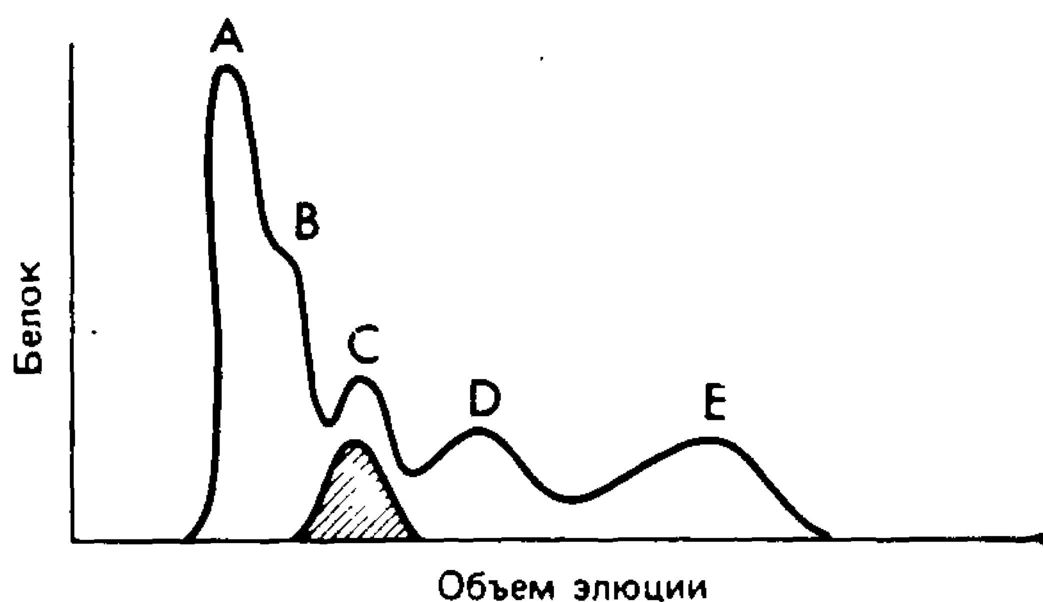


Рис. 5.8. Отделение одного белка (заштрихован) от других на гельфильтрующей колонке с использованием материалов различной пористости. *А*. Крупнопористый материал — фермент элюируется позднее и хорошо отделяется от белков A и B, но не от белка D. *Б*. Мелкопористый материал—фермент элюируется вблизи свободного объема и перекрывается с белком B; хорошо отделяется от белка D.

больших скоростей потока и уменьшить его турбулентность, что приводит к меньшему размыванию пиков (см. рис. 1.7). С другой стороны, разрешение у такой колонки может быть ниже, поскольку число гранул, а следовательно, и число элементарных актов гель-фильтрации, совершающихся по мере того, как белки входят в частицы геля и выходят из них, в расчете на каждую молекулу, будет меньше. Но главный недостаток короткой и толстой колонки заключается в том, что в ней трудно добиться равномерного нанесения образца и равномерного потока буфера. Даже если зона каждого компонента, которая по форме должна представлять собой правильный диск, искажается лишь в малой степени, это приводит к плохому разрешению (рис. 5.9).

В длинной и тонкой колонке белковые зоны менее подвержены искажениям в горизонтальной плоскости; во всяком случае такие искажения здесь не столь важны, так как образец занимает большее расстояние по высоте колонки (рис. 5.9). В повседневной практике гель-хроматографию проводят в колонках, длина которых в 20—40 раз превышает их диаметр. Неравномерное нанесение образца, искажение хроматографического слоя у стенок колонки в результате поверхностного натяжения и другие причины, приводящие к неравномерности пото-

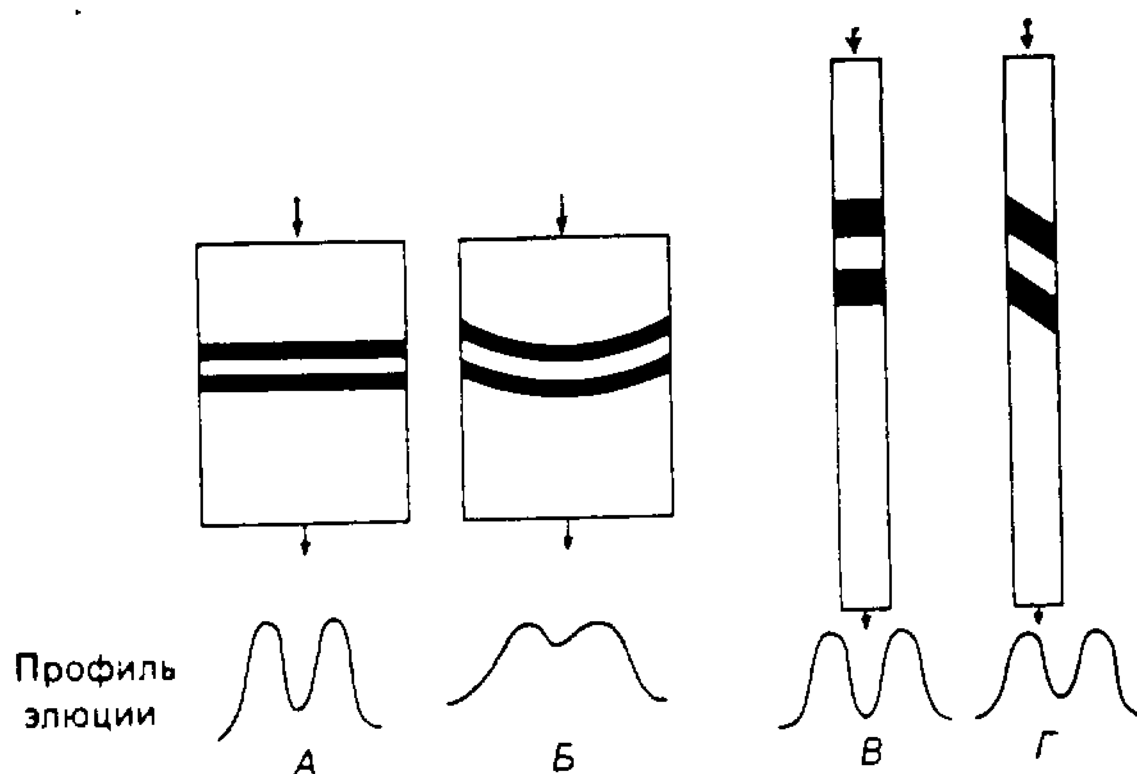


Рис. 5.9. Сравнение гель-фильтрации в толстой и короткой колонке с гель-фильтрацией в длинной колонке. При идеальном потоке (*А* и *В*) должны получаться одинаковые результаты. Незначительные отклонения потока в короткой колонке (*Б*) приводят к плохому разрешению, но существенно не влияют на результаты в длинной колонке (*Г*).

ка, в таких колонках оказываются менее существенными, чем в коротких и толстых колонках того же объема.

Компактность белковой зоны может зависеть от способа нанесения образца (см. ниже). Столь же важно обратить внимание на поведение выходящей из колонки белковой зоны. Перемешивание белковых зон в продольном направлении при использовании слишком широких колонок — частая ошибка, во многих случаях сводящая на нет результаты превосходного разделения. По той же причине проточные кюветы для регистрации количества белка должны иметь малые размеры, чтобы свести к минимуму возможность такого перемешивания; кроме того, их следует помещать как можно ближе к выходному отверстию колонки (рис. 5.10).

Колонку необходимо заполнять по возможности в один прием, чтобы предотвратить разделение гранул по размерам в процессе оседания (см. рис. 1.11). С этой целью используют суспензию, объем которой не более чем в два раза превышает объем осевшего материала. Заполнение колонки следует производить как можно быстрее без использования давления. Хороший способ создать более высокую скорость потока — это присоединить снизу к колонке длинную, но не слишком узкую трубку, с тем чтобы увеличить общую высоту столба жидкости; тогда падение давления в самой колонке окажется выше.

Очень важным условием хорошего разделения является нанесение образца. Чем ровнее он нанесен, тем лучше будет конечный результат. С успехом используются аппликаторы, благо-

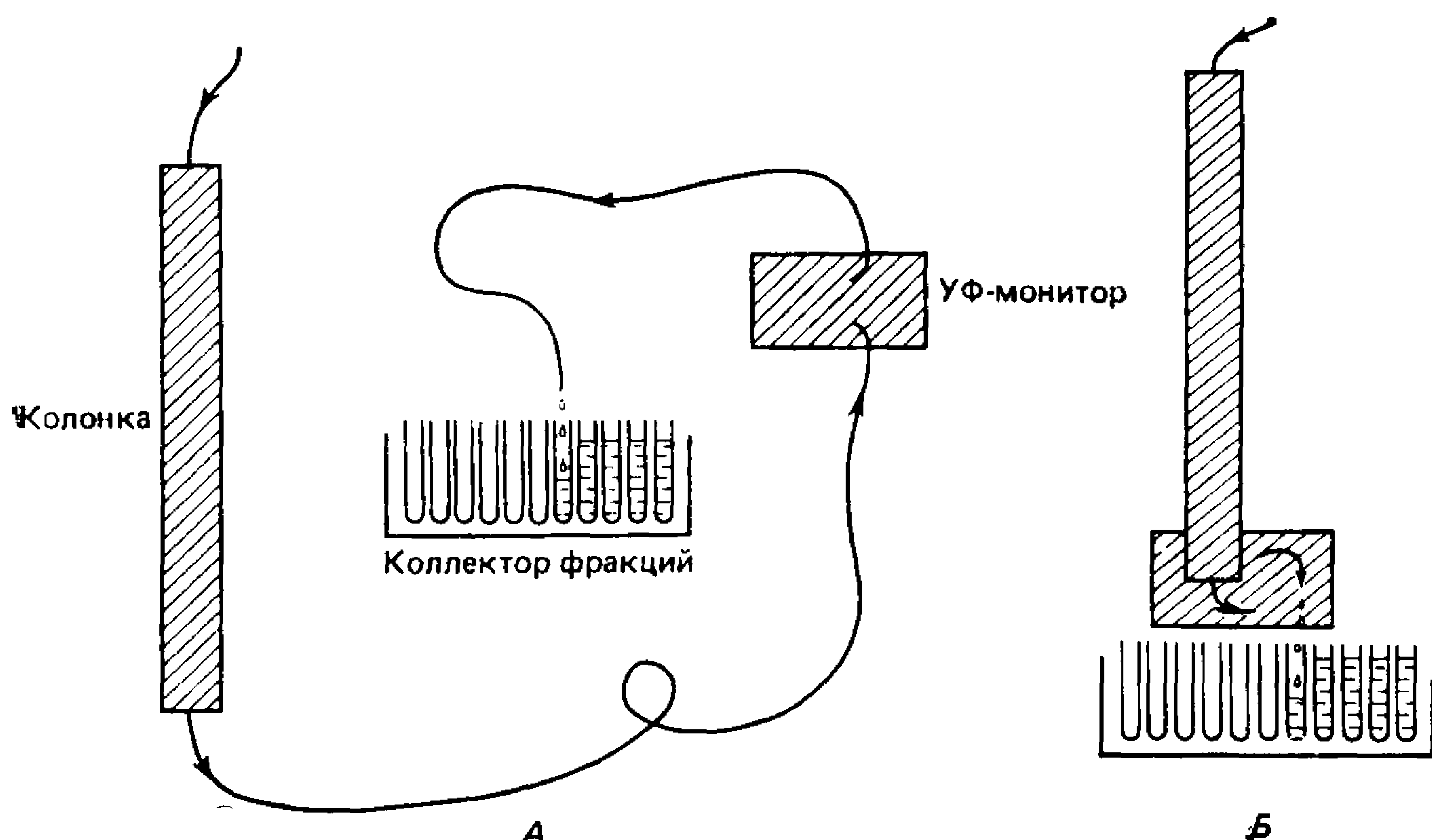


Рис. 5.10. Неправильный (*А*) и правильный (*Б*) способы установки колонки для гель-фильтрации (или любой другой) по отношению к УФ-монитору и коллектору фракций. Длина соединительной трубки должна быть минимальной, причем трубка должна быть как можно уже, но не затруднять потока.

даря удачной конструкции которых можно добиться равномерного потока жидкости через всю поверхность геля (см. рис. 1.8). Нельзя допускать, чтобы между поверхностью геля и аппликатором создавалось значительное мертвое пространство, так как это приводит к смешиванию слоев (см. рис. 1.10). Не следует применять растворы образца, имеющие меньшую плотность, чем буфер (например, растворы, содержащие ацетон), поскольку при последующем промывании колонки этим буфером он будет стремиться вытеснить вверх последние порции образца и эти порции будут медленно просачиваться в гель уже после того, как весь остальной образец войдет в гель. Аппликатор следует испробовать с помощью окрашенного образца: если зона образца будет неравномерной, лучше нанести его вручную. Для этого аппликатор удаляют, дают буферу впитаться в поверхность геля, закрывают зажим на выходной трубке и затем аккуратно наносят образец с помощью пастеровской пипетки, давая ему проникнуть на 5—10 мм внутрь слоя геля, и в то же время перемещают пипетку по периметру колонки (рис. 5.11). Когда весь образец будет нанесен, зажим открывают и дают образцу впитаться в поверхность геля. Затем повторяют весь процесс, используя буфер (примерно тот же объем, что и объем образца), — дают ему войти в гель, добавляют еще немного бу-

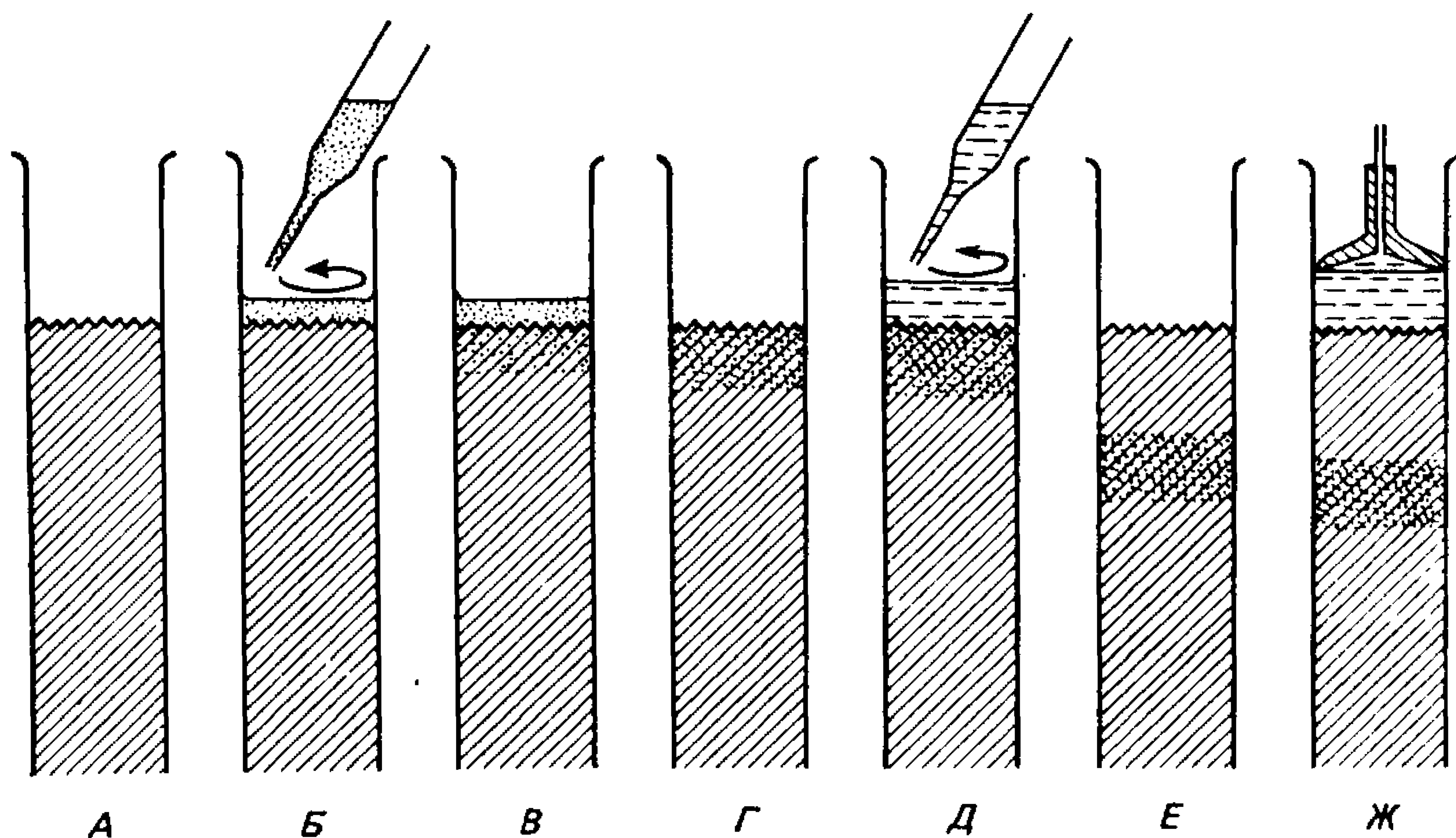


Рис. 5.11. Нанесение образца на поверхность гель-фильтрующей колонки вручную. Следует соблюдать осторожность, чтобы не нарушить ровную поверхность геля. *А*. Буферу дают полностью впитаться в гель, после чего закрывают кран. *Б*. Образец наносят на колонку с помощью пипетки; открывают кран. *В*. Дают образцу проникнуть в гель. *Г*. Образец полностью впитался в гель; закрывают кран. *Д*. Наносят буфер и открывают кран. *Е*. Дают буферу полностью впитаться в гель и закрывают кран. *Ж*. Наносят еще какой-то объем буфера и присоединяют к колонке аппликатор; мертвое пространство в верхней части колонки допустимо.

фера и присоединяют аппликатор для непрерывной подачи буфера.

Следует помнить, что фермент будет элюироваться с колонки в том буфере, который содержится в ней до начала гель-фильтрации. Поэтому неважно, в каком буфере образец наносится на колонку или элюируется с нее. Таким образом, если нужный фермент необходимо элюировать в каком-то особом и относительно дорогостоящем буфере, нет смысла тратить его зря. Перед тем как нанести образец, нужно промыть колонку объемом этого специального буфера, равным одному объему колонки. Затем проводят гель-фильтрацию, используя какой-либо обычный дешевый буферный раствор.

Гравитационная неустойчивость, возникающая в ходе нанесения образца (см. рис. 5.4), особенно велика, когда используются очень плотные растворы, такие, как растворенные осадки, полученные при фракционировании сульфатом аммония. Это особенно трудная проблема в случае применения мягких гелей типа сефадекса G-200. При использовании современных материалов с жесткими зернами плотная поверхность хроматографического слоя позволяет предотвратить избыточное смешивание

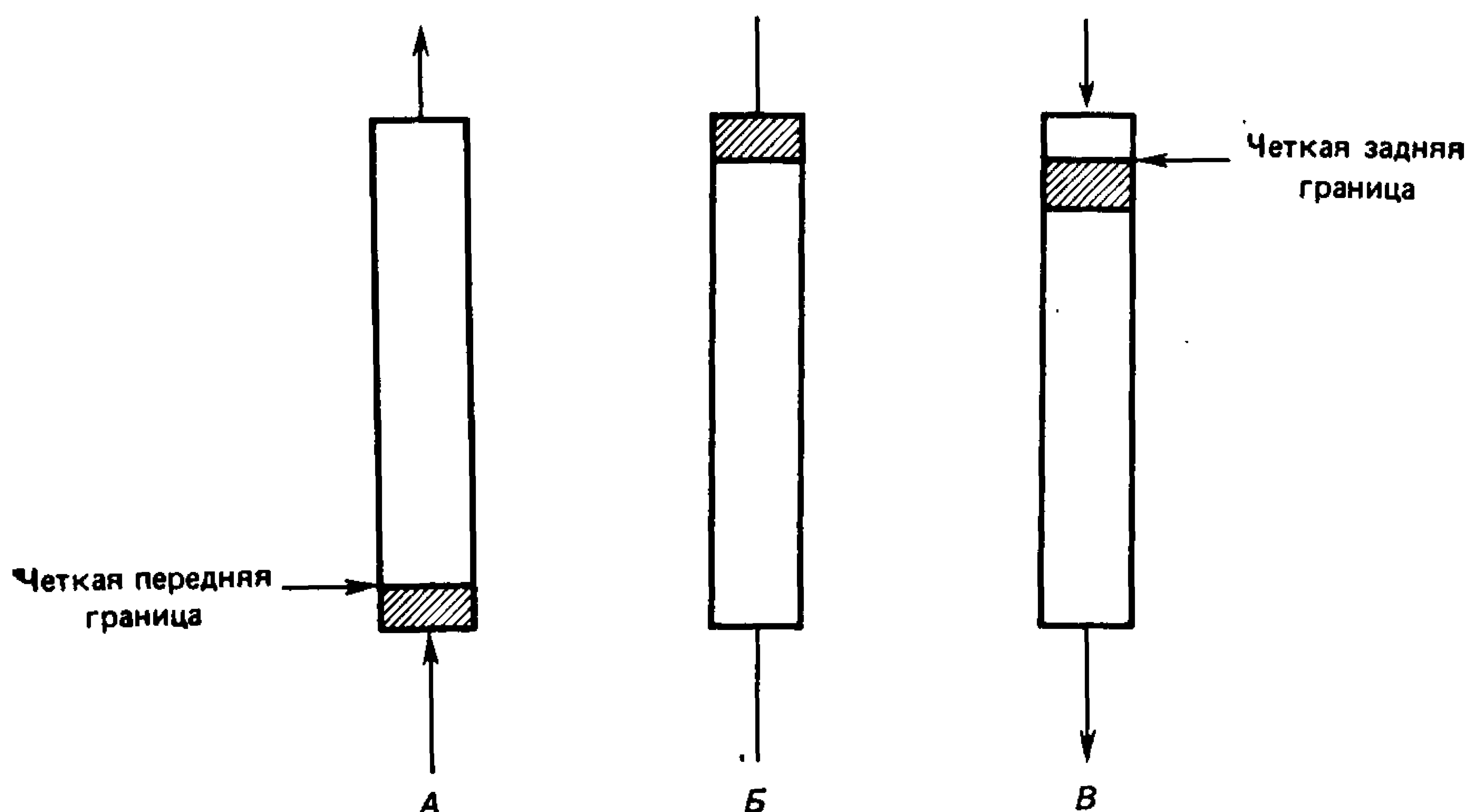


Рис. 5.12. Схема, демонстрирующая, каким образом можно избежать гравитационной неустойчивости, показанной на рис. 5.5. *А*. Плотный раствор образца наносят снизу колонки при восходящем потоке жидкости. *Б*. После того как весь образец нанесен, колонку переворачивают. *В*. Менее плотный буфер следует за образцом — колонка промывается нисходящим потоком.

при наслаивании плотного раствора на менее плотный буфер. Тем не менее более высокое разрешение (за счет того, что зона разделяемых веществ образует очень тонкий и плотный слой) получается, если образец наносят снизу колонки при восходящем потоке жидкости, а затем переворачивают колонку так, что менее плотные слои буфера оказываются под поверхностью геля (рис. 5.12). Это не всегда удобно делать, но стоит попробовать, если разрешение хуже, чем ожидалось.

Ниже суммированы практические рекомендации. Размеры колонки должны в 30—100 раз превышать объем образца. Исходная концентрация белка в идеале должна составлять 10—20 мг·мл$^{-1}$, самое большее — 30 мг·мл$^{-1}$. Таким образом, 100 мг белка следует растворить в объеме не меньшем чем 3,5 мл, лучше 5—6 мл, и использовать колонку объемом 200—250 см^3. Длина колонки должна в 20—40 раз превышать ее диаметр, т. е. для указанного количества белка подходящими будут колонки диаметром 2,5 и длиной 50 см или соответственно 1,8 и 100 см. Идеальные размеры колонки можно определить следующим образом: диаметр$=\sqrt[3]{m/10}$ см, где m — количество белка в мг, а длина$=30\times$диаметр.

Скорости потока ограничиваются максимально достижимыми скоростями протекания буфера. Современные жесткие мате-

риалы выдерживают скорость потока, превышающую скорость установления равновесия, поэтому необходимо знать рекомендации фирм-изготовителей. Для сефакрилов пригодны скорости потока до 30 $см \cdot ч^{-1}$ (30 $мл \cdot ч^{-1} \cdot см^{-2}$), но для ультрагелей рекомендуются меньшие скорости (см. также гл. 7). Время разделения можно вычислить, зная размеры колонки. Если фермент выходит в середине интервала фракционирования для сефакрилов, то в приведенном выше примере с колонкой диаметром 2,5 и длиной 50 см он будет появляться в элюате примерно через 2 ч после нанесения (при скорости потока 30 $см \cdot ч^{-1}$). Для колонки размерами $1{,}8 \times 100$ см время будет в два раза больше, хотя на длинной колонке разрешение может быть несколько выше. Как уже указывалось, более жесткие материалы с мелкими гранулами позволяют быстрее разделять вещества под давлением, и вполне вероятно, что методы с применением умеренного давления (промежуточные между рутинными операциями, проводимыми при низком давлении, и быстрыми операциями под высоким давлением с использованием техники ЖХВД) получат более широкое распространение.

5.2. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ: ОБЫЧНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Разделять смеси белков посредством электрофореза начали еще в первые годы XX в. Однако до сравнительно недавнего времени этот метод применялся лишь в аналитических целях. В течение 30 и более лет широко использовался довольно сложный аппарат Тизелиуса для электрофореза в свободном растворе, однако с его помощью не всегда удавалось добиться полного разделения компонентов. И до сих пор остается справедливым утверждение, что электрофорез — это в основном аналитический метод. Все современные более тонкие электрофоретические методы, такие, как гель-электрофорез, изоэлектрическое фокусирование и изотахофорез, были разработаны главным образом с целью улучшить способы анализа смесей белков. Тем не менее каждый из этих методов может быть приспособлен для препаративных целей с использованием десятков и даже сотен миллиграммов белковой смеси.

Электрофоретические стадии не так уж часто включаются в схемы очистки ферментов. Для этого есть много причин, в том числе сложность и дороговизна соответствующей аппаратуры, а также трудности, связанные с ее эксплуатацией. Еще одна, не менее важная причина — это то, что электрофоретическое разделение зависит преимущественно от разницы в величине зарядов (или изоэлектрических точек) разделяемых белков — принцип, который широко применяется в ионообменной хрома-

тографии. Лишь в случае методов высокого разрешения, таких, как гель-электрофорез (использующий также различия в величине молекул) и изоэлектрическое фокусирование, можно добиться такого разделения, какое трудно получить за одну стадию с помощью других методов. Однако электрофоретические методы с использованием в качестве носителей гелей связаны со многими трудностями, которые будут обсуждаться ниже. Поэтому, хотя препаративный электрофорез может быть очень ценным методом в специализированной лаборатории по очистке белков, начинающим не следует даже и помышлять о нем.

Принципы электрофореза

Молекула белка в растворе при любом значении pH, отличающемся от ее изоэлектрической точки, имеет некий средний целочисленный заряд. Это приводит к тому, что белок движется в электрическом поле. Движущая сила определяется величиной напряженности электрического поля E (В·см$^{-1}$), умноженной на суммарный заряд частицы z. Этой силе противостоят силы вязкости среды (так же, как и при центрифугировании, см. разд. 1.2), пропорциональные коэффициенту вязкости η, радиусу частицы r (стоксовскому радиусу) и скорости v.

В стационарном состоянии

$$E \cdot z = 6\pi\eta r v. \quad (5.1)$$

Удельная подвижность $u = v/E$ может быть выражена как

$$u = \frac{z}{6\pi\eta r}. \quad (5.2)$$

Иногда утверждается, что электрофорез в свободном растворе основан на разделении молекул лишь по величине заряда и не зависит от их размеров. Однако из уравнения (5.2) можно видеть, что подвижность u обратно пропорциональна стоксовскому радиусу. Следовательно, сферическая молекула, имеющая размер 20 000 дальтон и заряд —5, должна обладать иной подвижностью, чем молекула с размером 40 000 дальтон и зарядом —5, но такой же, как молекула, которая имеет размер 160 000 дальтон и заряд —10. Тем не менее на практике при электрофорезе в свободном растворе первые два белка вряд ли будут разделены. Это связано с техническими трудностями создания устойчивой границы между раствором белка и буфером, а также с тем, что в типичном эксперименте происходит значительная диффузия. Электрофорез с подвижной границей (метод Тизелиуса), используемый в качестве аналитической системы, редко позволяет различить более восьми компонентов даже при разделении очень сложных смесей, что обусловлено диффузией,

приводящей к перекрыванию белковых зон, а иногда и белок-белковыми взаимодействиями. Взаимодействия между разными белками при низкой ионной силе могут быть нескольких типов. Для многих белков, относящихся к альбуминам, т. е. для хорошо растворимых белков, наибольшее значение имеют электростатические взаимодействия. Эти взаимодействия можно свести к минимуму, увеличив ионную силу (см. обсуждение методов всаливания в разд. 3.2 и элюции солевыми растворами с ионообменников в разд. 4.2), но повышение ионной силы увеличивает силу тока при электрофорезе, что ведет к сильному нагреву смеси.

Важнейшая проблема при конструировании приборов для препаративного электрофореза — это необходимость эффективного отвода тепла, с тем чтобы все части системы находились при постоянной температуре. Поэтому приходится идти на компромисс между желанием ослабить белок-белковые взаимодействия путем повышения концентрации соли и стремлением уменьшить тепловыделение путем понижения концентрации соли. Все присутствующие в системе соли обычно входят в состав буфера (при этом нет никакой необходимости использовать сильные буферы, если продукты электролиза отделены от белков). Можно применять буферные смеси с низкой проводимостью, в которых ионные компоненты имеют относительно большие размеры и низкую электрофоретическую подвижность, например Н-трис$^{+}$. В составе буфера эти ионы еще менее подвижны, поскольку часть времени они находятся в незаряженном состоянии, например борат$^{-}\rightleftarrows$Н-борат. Поэтому трис-боратный буфер с pH 8—9 — один из самых популярных буферов для электрофореза. При pH 7—8 в качестве буфера с низкой проводимостью рекомендуется трис-МОПС (МОПС — морфолинопропансульфонат). Электрофорез обычно проводят при нейтральных или слабощелочных pH, когда большинство белков мигрирует к аноду.

С помощью гель-электрофореза молекулы, имеющие в иных условиях близкие электрофоретические подвижности, разделяются по их размерам. Первоначально для этой цели использовали крахмальный гель [128], который и до сих пор применяется в аналитических целях. Однако крахмальный гель никогда не удавалось успешно использовать в препаративных масштабах. Универсальным средством для анализа белков (а теперь и нуклеиновых кислот) в биохимических лабораториях стал полиакриламидный гель [129]. Он также пригоден и для препаративного электрофореза. Поскольку этот гель, представляющий собой трехмерную сетку нитей, образующих поры разных размеров [130], обладает разной эффективной вязкостью в зависимости от размеров молекул, уравнение (5.2) для электро-

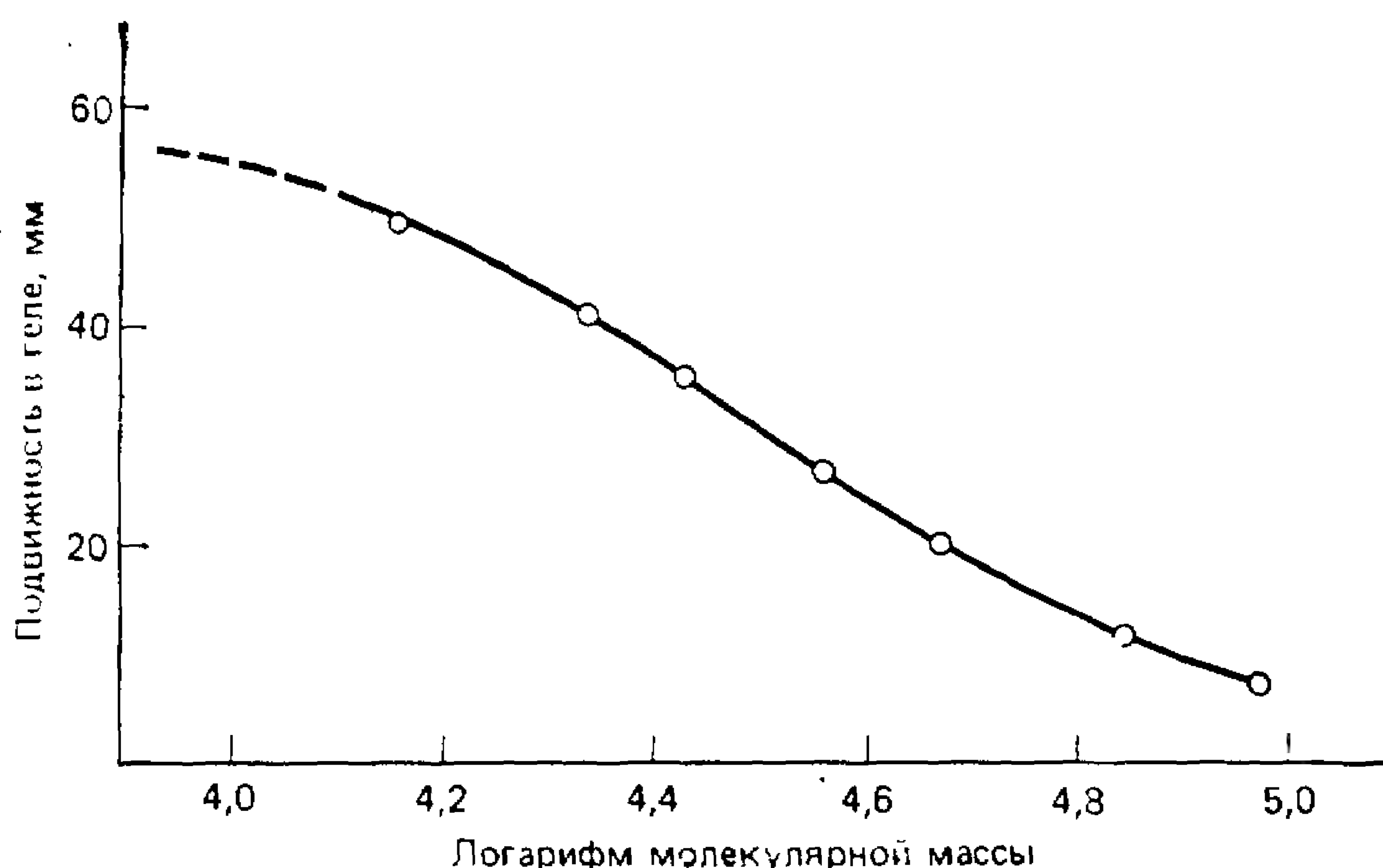


Рис. 5.13. Зависимость электрофоретической подвижности от молекулярной массы белковых молекул сходной формы и одинаковой плотности заряда. Все молекулы очень малых размеров имеют одинаковую подвижность из-за того, что гель оказывает им недостаточное сопротивление, обусловленное его вязкостью.

форетической подвижности $u=z/6\pi\eta r$ усложняется. В области «молекулярно-ситового распределения» подвижность линейно связана с логарифмом молекулярной массы для всех веществ, имеющих молекулы сходной формы [131], так что в присутствии додецилсульфата натрия (разд. 9.1) [132] $u=u_0(A-\lg$ мол. масса$)/A$, где A — логарифм молекулярной массы, линейно экстраполированной к нулевой подвижности (рис. 5.13). Так как u_0 — подвижность малой молекулы, не взаимодействующей с гелем, — равна $z/6\pi\eta r$, то

$$u=\frac{z}{6\pi\eta r}\cdot\frac{A-\lg \text{мол. масса}}{A},$$

и величину $A\eta/(A-\lg$ мол. масса) можно рассматривать как эффективную вязкость в среднем диапазоне молекулярных масс.

Разделение при гель-электрофорезе происходит как по зарядам, так и по размерам молекул. Гель можно приготовить таким образом, чтобы он имел размеры пор, подходящие для данной группы разделяемых белков. Важнейшее преимущество гелей — это их стабилизирующее действие, проявляющееся в снижении до минимума конвекционной и диффузионной подвижности белков. Поэтому белковая полоса остается узкой все время, пока белок движется через гель, и это приводит к тому, что до-

стигается полное разделение белков с очень близкой подвижностью. Этот эффект еще будет обсуждаться в гл. 9. Для аналитических целей гели превосходны. Что же касается препаративных методов, то здесь, несмотря на то что гели обладают потенциально ценными свойствами, при работе с ними возникает множество серьезных проблем.

Методы препаративного электрофореза

Горизонтальный электрофорез

Для успешного электрофореза необходим «канал», в котором происходит разделение. Он может представлять собой колонку (вертикальную), плоскую ванну или прямоугольный блок (горизонтальный), в которых движутся белки. Связь обоих концов этого «канала» с электродами осуществляется через большие резервуары с буфером. Необходима также система охлаждения, чтобы поддерживать постоянной температуру «канала». Из-за того что в свободном растворе трудно поддерживать устойчивую границу, буфер в этом канале может быть смешан с инертным порошком или материалом в виде гранул, что позволяет снизить до минимума как гравитационную, так и диффузионную нестабильность. Простейшая система представляет собой горизонтальный блок. Сухой порошок крахмала, сефадекс G-25 (не удерживающий белок) или порошок любого другого полимерного материала смешивают с буфером так, чтобы образовалась густая суспензия, которую вносят в прибор. Избыток буфера удаляют. Вместо суспензии можно использовать очень крупнопористый гель, например 2%-ный агар или агарозу. Концы геля соединяют с увлажняемой тканью или другим материалом, образующим контакт с наполненными буфером резервуарами, в которые помещены электроды (рис. 5.14).

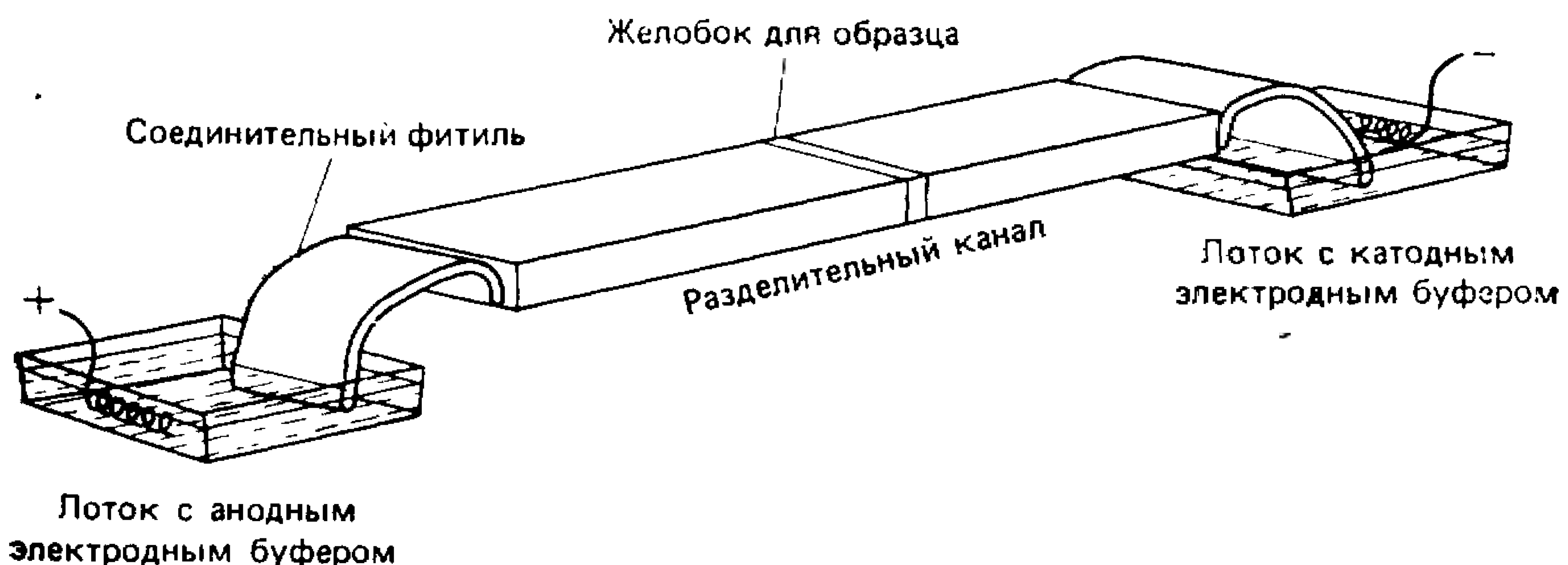


Рис. 5.14. Горизонтальный препаративный электрофорез с порошком или гелем агара в качестве стабилизатора.

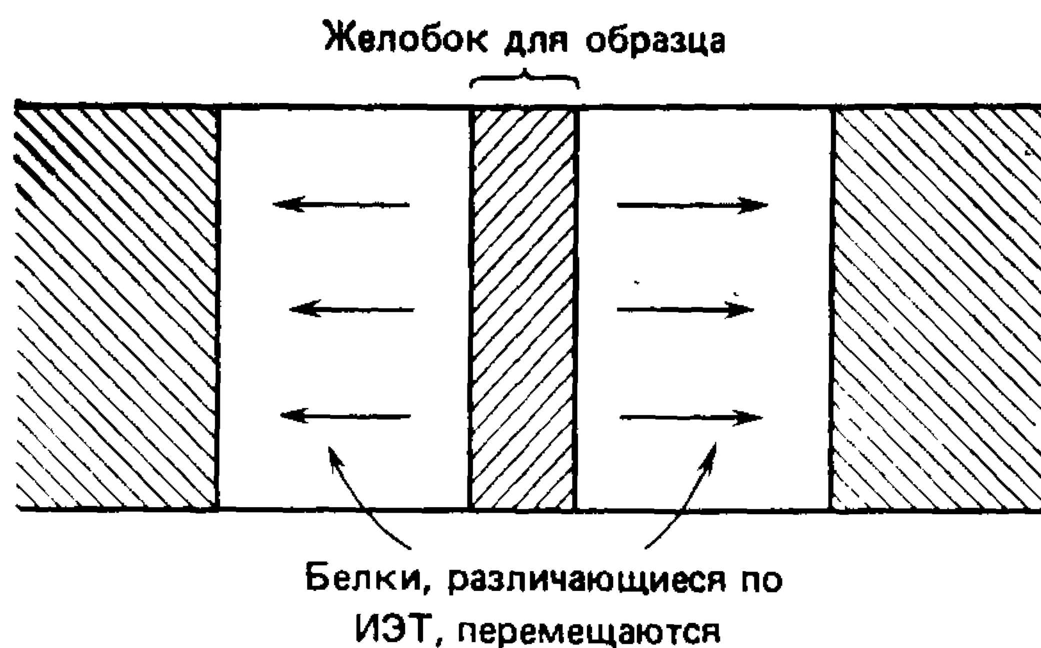


Рис. 5.15. Электрофорез в изоэлектрической точке. Нужный фермент неподвижен, тогда как белки с другими изоэлектрическими точками движутся каждый в своем направлении.

В блоке геля прорезают вертикальную канавку и заполняют ее суспензией порошка в белковом растворе (предварительно уравновешенном в том же буфере). Затем включают ток и начинают электрофорез. Если прибор помещен в холодной комнате и поддерживается низкая сила тока, то достаточно охлаждения за счет естественной конвекции.

После проведения электрофореза блок разрезают на части и, обрабатывая каждую часть небольшим количеством буфера, вымывают белок. Таким методом обычно достигается не очень хорошее разрешение, как об этом уже говорилось выше, и оно редко бывает лучше, чем при ионообменной хроматографии. Вместе с тем белки в данном случае все время остаются в растворе и потому в меньшей степени подвергаются вредным воздействиям.

Интересной разновидностью является электрофорез в изоэлектрической точке [133], который проводят, если ее значение известно для нужного фермента. Белковую смесь готовят в буфере при pH, соответствующем изоэлектрической точке этого фермента. Образец помещают в канавку, сделанную в агарозном геле, и начинают электрофорез. Фермент остается в канавке, тогда как загрязняющие белки движутся в обоих направлениях (рис. 5.15). Исходное требование — найти значение pH, при котором фермент не будет двигаться. Оно может отличаться от изоэлектрической точки, определенной методом изоэлектрического фокусирования (см. разд. 5.3). Изоэлектрическая точка часто зависит от используемого буфера из-за связывания белком буферных ионов. Связывание фосфат- и цитрат-ионов — это обычное явление, которое приводит к снижению изоэлектрической точки. При изоэлектрическом фокусировании проводится аппроксимирование к нулевой концентрации буфера, и найденное при этом значение на самом деле представляет собой «изоионную точку», т. е. значение pH, при котором отсутствует связывание ионов с белковой молекулой.

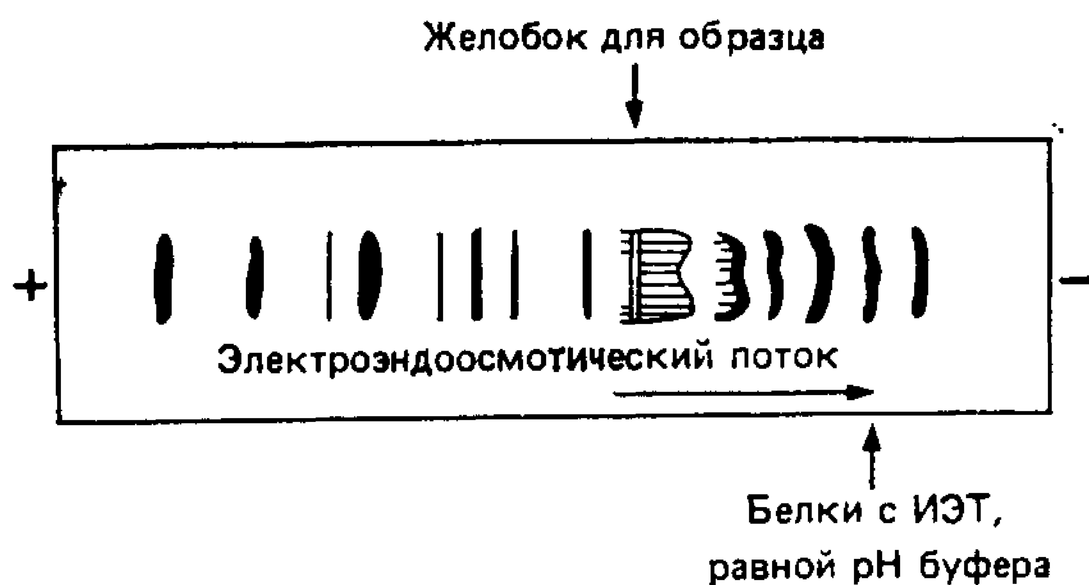


Рис. 5.16. Влияние электроэндоосмоса на подвижность белков.

Другой фактор, влияющий на реальную (но не теоретическую) подвижность, — это электроэндоосмотический ток, т. е. поток основной массы жидкого растворителя под влиянием электрического поля за счет иммобилизованных заряженных групп, присутствующих на стенках электрофоретической камеры и на поверхности любой стабилизирующей среды — порошка или геля.

Каждый ион ассоциирован с несколькими молекулами воды, которые мигрируют вместе с ним. Иммобилизованные анионы, такие, как карбоксилат-ионы на молекулах крахмала, не могут мигрировать, но ассоциированные с ними противоионы мигрируют. Будучи катионами, они перемещаются к катоду, что приводит к результирующему движению воды в этом направлении (суммарный результат переноса воды другими буферными ионами в обоих направлениях близок к нулю). В случае таких материалов, как крахмал и агар, электроэндоосмос может быть столь значительным, что многие компоненты будут мигрировать к катоду, несмотря на то что они имеют отрицательный заряд (рис. 5.16).

Ток жидкости к катоду происходит благодаря наличию иммобилизованных отрицательных зарядов (карбоксилат-, сульфат- и фосфат-ионов), обычных для биологических полимеров. Даже самая чистая агароза несет все же несколько отрицательных зарядов и электроэндоосмос может быть устранен лишь в том случае, если гель формируется в присутствии небольших количеств положительно заряженных полимеров типа ДЭАЭ-декстрана, нейтрализующих этот эффект. В препаративном электрофорезе электроэндоосмос не является слишком серьезной проблемой, поскольку здесь более важна не *причина* перемещения полосы белка, а достигаемое при этом отделение ее от других белковых компонентов смеси.

Вертикальный электрофорез

Горизонтальный «блочный» электрофорез не нашел широкого применения, несмотря на то что он не нуждается в сложной аппаратуре. Вертикальный колоночный электрофорез, особенно в геле, используется значительно чаще. В отсутствие геля есть два способа стабилизировать жидкость в колонке; они используются также при изоэлектрическом фокусировании и изотахофорезе (см. разд. 5.3). Один из них основан на том же принципе, который используется в горизонтальных системах, — это заполнение большей части объема колонки инертным порошком, так что миграция белка происходит в эффективном объеме между частицами. Второй способ заключается в гравитационной стабилизации жидкости с помощью градиента плотности сахарозы. Плотный раствор сахарозы помещают на дно колонки, а поверх него наслаивают раствор с равномерно убывающей плотностью, так что в верхней части колонки, куда вводят образец, концентрация сахарозы равна или почти равна нулю. Следует отметить, что сахароза в колонке лишь стабилизирует жидкость, сводя к минимуму конвекционные токи. Она лишь немного влияет на миграцию белка вследствие увеличения вязкости по мере перемещения белка вниз по колонке. Это замедляет движение белка, но вместе с тем снижает его диффузию. Обычный способ удалить белок из колонки после электрофореза — это просто дать жидкости стечь и собрать ее в виде фракций с помощью коллектора. Эту операцию нужно делать медленно, чтобы не перемешать отдельные зоны белка, движущиеся вниз по колонке.

Системы вертикального гель-электрофореза

Описанные выше методы дают лишь грубое разделение компонентов смеси. В свободном растворе перекрывание полос из-за перемешивания их за счет диффузии достаточно велико и результаты редко превосходят те, которых можно достичь другими методами. Методы с использованием мелкопористых гелей намного предпочтительнее благодаря свойственной им высокой степени разрешения. Однако в этом случае возникает одно затруднение, связанное с тем, что после завершения электрофореза из геля необходимо извлечь белок, а это можно осуществить только с помощью довольно сложной аппаратуры. Применение гидростатического давления не дает результата, так как поверхностное натяжение слишком велико. Можно раскрошить гель, но даже после размола его до очень мелких частиц выход белка (активного) обычно весьма низок. Более удачный способ — это сбор фракций по мере того, как каждый компонент

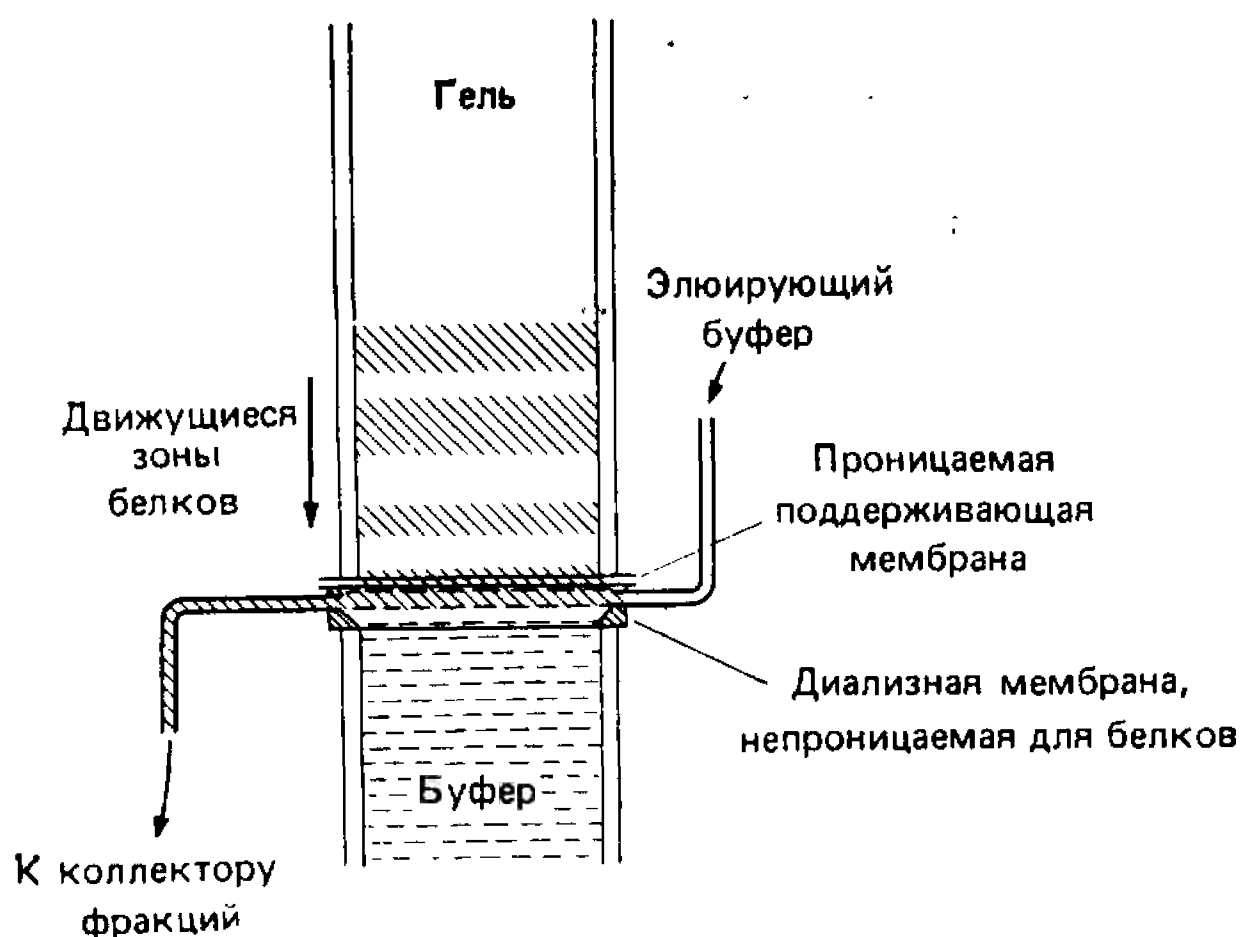


Рис. 5.17. Элюция белковых зон, выходящих из вертикальной гелевой колонки в процессе электрофореза.

выходит из гелевой колонки в перпендикулярно направленный поток буфера. Этот принцип воплощен в приборе «LKB Uniphor», серийном аппарате для препаративного электрофореза (рис. 5.17). К сожалению, образовавшиеся в геле высококонцентрированные зоны белка сильно разбавляются при переходе в буфер, и этот недостаток может быть очень важным, если выделяемый фермент нестабилен в разбавленных растворах. В сочетании с этим прибором можно использовать концентратор непрерывного действия, основанный на ультрафильтрации растворов через полые волокна, так что собираемые фракции можно быстро вновь сконцентрировать. Из-за того что существуют разнообразные методы и самодельные приборы, в литературе описано много способов препаративного электрофореза, и начинающему следует познакомиться с ними, прежде чем решить, какая система удовлетворяет его нуждам и бюджету [134—138].

Буферные системы

Состав буфера, используемого для контроля pH в ходе электрофореза, имеет весьма важное значение, поскольку ток, протекающий по «каналу», в котором происходит разделение, создается ионами буфера. Очень подвижные ионы (ионы металлов Na^+, K^+, Mg^{2+} и простые анионы F^-, Cl^-, Br^-, SO_4^{2-},

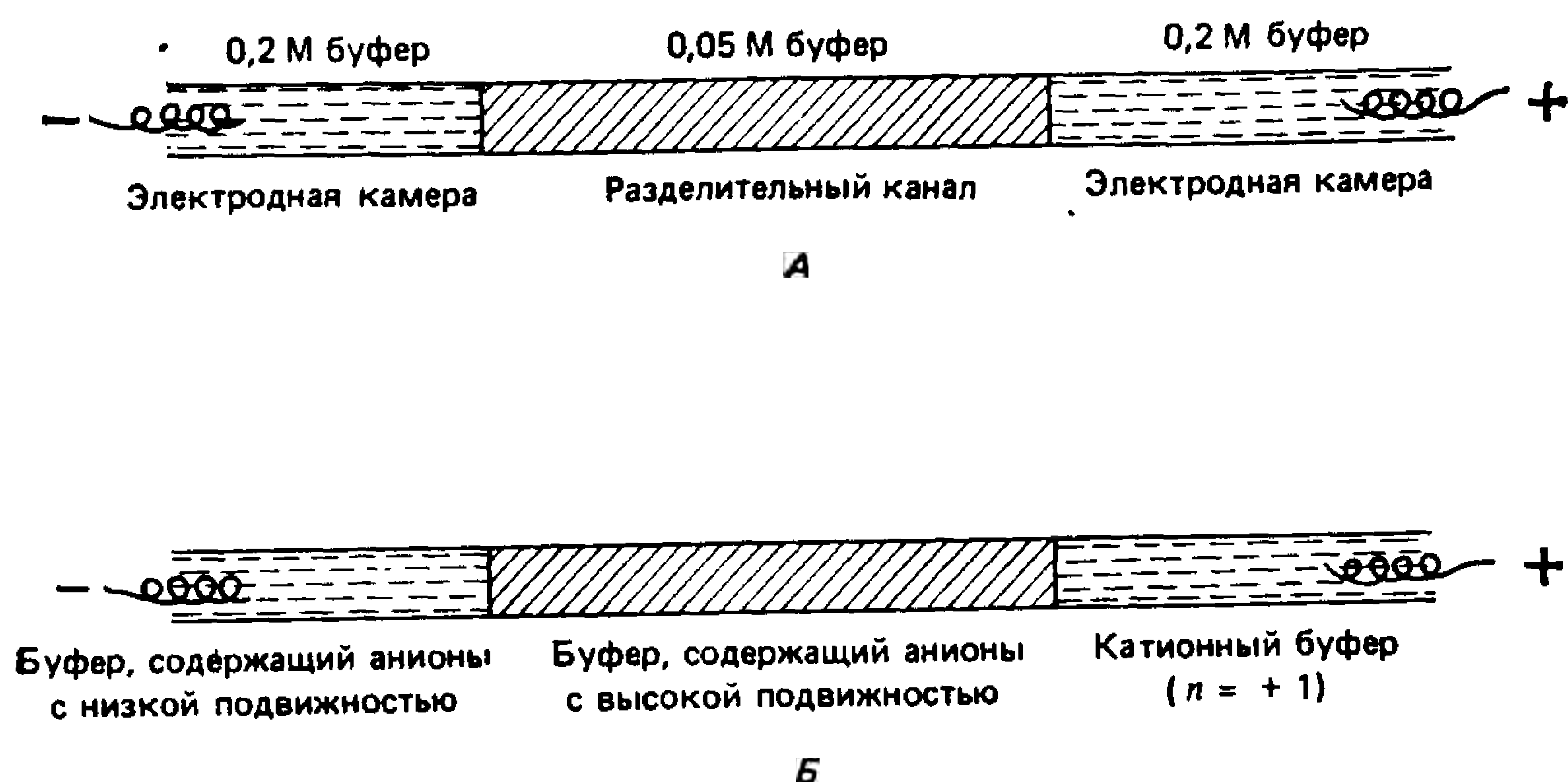


Рис. 5.18. Расположение буферов в непрерывной (*А*) и «прерывистой», или дискретной (*Б*), буферных системах.

HPO_4^{2-}) несут большой ток благодаря своей высокой мобильности. Это ведет к нагреву, и, если только нет особых причин использовать подобные ионы, их следует исключить. Объемистые органические ионы имеют намного меньшую подвижность, особенно если они входят в состав буферов типа $n=+1$ или $n=-1$ (см. разд. 6.1). С другой стороны, вполне вероятно, что небольшие простые катионы более эффективно препятствуют белок-белковым взаимодействиям, чем объемистые органические ионы; таким образом, если возникает проблема белок-белковых взаимодействий, следует использовать некоторые простые соли.

Ниже будут описаны две буферные системы для обычного электрофореза — «прерывистая» (неоднородная, или дискретная) и непрерывная (однородная). Последняя весьма проста: один и тот же буфер используется в процессе всего электрофореза, так что в электрофоретическом канале не происходит изменения состава буфера. Чтобы уменьшить потери напряжения на участках, соединяющих электроды с истинным электрофоретическим каналом, можно использовать буферные растворы большой концентрации (рис. 5.18, *А*). Обычно применяют буферы с суммарной ионной силой порядка 0,05—0,15. Это — компромисс между низкой проводимостью, позволяющей применять высокое напряжение, но способствующий белок-белковым взаимодействиям, и системой с минимумом таких взаимодействий, но более высокой проводимостью, в результате чего возникает проблема нагрева. Нагрев можно уменьшить, снизив силу тока.

Используется такое большое число разных буферных систем, что перечислять их здесь не имеет смысла. Для обычного гель-электрофореза в качестве непрерывной буферной системы часто применяют трис-борат с pH около 8 или несколько выше и 2-амино-2-метил-1,3-пропандиолглицинат, pH 9—9,5. Ионная сила этих буферных смесей зависит от выбранного значения pH: при более высоких значениях pH требуемая концентрация основания может доходить до 0,2 М, поскольку большая его часть остается незаряженной и не вносит вклад в проводимость. Высокие значения pH обычно используются с тем, чтобы большинство белков мигрировало к аноду. Однако для особых целей применяется много буферных систем с низкими значениями pH.

Дискретные буферные системы, используемые в гель-электрофорезе, способствуют сужению зон белка. В большинстве случаев они применяются в аналитических целях, но могут быть использованы и в препаративном электрофорезе. Принцип заключается в том, что между стартовыми буферными ионами и следующими за ними ионами, имеющими более низкую подвижность, создаются дискретные зоны Кольрауша (рис. 5.18, *Б*). На границе между этими двумя дискретными областями зоны разделяемых веществ и буферных ионов самопроизвольно сужаются, что можно часто наблюдать по изменению коэффициента преломления, обусловленному резким изменением концентраций на этой границе. Причины, вызывающие сужение белковой зоны, заключаются в следующем: 1) снижение проводимости сразу же за линией раздела между двумя областями с разной подвижностью создает высокий локальный градиент потенциала; это заставляет «замыкающие» белковые молекулы мигрировать быстрее, так что в конце концов они догоняют основную полосу, и 2) более высокое значение pH сразу же позади указанной линии раздела приводит к такому же эффекту, который описан в п. 1).

К типичным дискретным буферным системам (дискретность которых обусловлена анионами) следует отнести фосфат- и цитрат-ионы, ион ЭДТА и хлорид-ион, играющие роль подвижных стартовых анионов, и следующие за ними анионы с низкой подвижностью, которые обычно представляют собой буферы типа $BH = B^- + H^+$. Низкая подвижность такого буфера в известной степени обусловлена тем, что в каждый данный момент часть его молекул не заряжена. При pH 8—10 чаще всего используются борат-ионы или глицинат-ионы. В области pH 6—8 с успехом применяются цвиттер-ионы типа морфолиноэтансульфоната (МЭС) или морфолинопропансульфоната (МОПС) [139].

Аффинный электрофорез

Как и другие аффинные методы, аффинный электрофорез основан на том, что поведение интересующего нас фермента изменяют путем введения специфического по отношению к нему лиганда. В данном случае под поведением понимается электрофоретическая подвижность. Существуют два возможных способа проведения такого электрофореза. Первый — включение заряженного лиганда в буфер, что приводит к повышению или снижению подвижности белка в зависимости от разницы между значениями его суммарного заряда в отсутствие и в присутствии лиганда. При препаративном электрофорезе в отсутствие лиганда происходит отделение группы белков с одинаковой средней подвижностью. Если подвергнуть такой образец повторному электрофорезу в присутствии лиганда, то нужный фермент должен отделиться от неспецифических белков (рис. 5.19). Однако это не более чем теоретические предпосылки.

Второй способ, который дает хорошие результаты, заключается в иммобилизации, или включении, лиганда в носитель для электрофореза, например в гель или стабилизирующий порошок, используемый в электрофоретическом канале. Этот способ аналогичен широко применяемому аналитическому методу «ракетного» иммуноэлектрофореза. Второй способ проведения аффинного электрофореза существует в нескольких вариантах [140—142], в том числе в препаративном; в этом случае иммо-

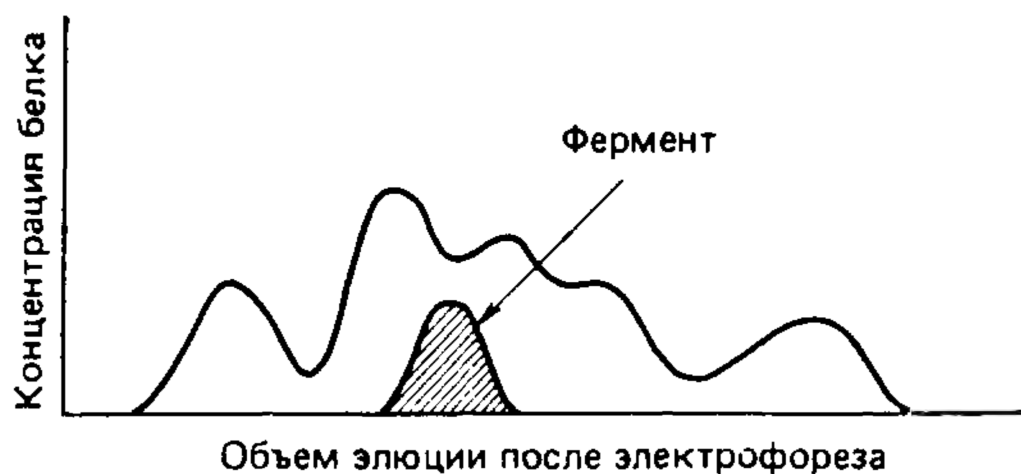




Рис. 5.19. Принцип аффинного электрофореза первого типа (см. текст). *А*. Без лиганда. *Б*. Фракция, содержащая фермент, подвергнута повторному электрофорезу в присутствии лиганда.

билизованный лиганд замедляет движение фермента в электрофоретическом канале. Этот способ пригоден также для изучения и измерения констант взаимодействия. Наиболее крупные успехи были достигнуты при использовании иммобилизованных лектинов для разделения гликопротеинов [141] и иммобилизованного цибакрона голубого (см. разд. 4.1) для выделения дегидрогеназ [142]. В недавно появившемся обзоре по этому вопросу [143] суммированы трудности и возможные направления развития этого метода.

5.3. ИЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЕ ФОКУСИРОВАНИЕ И ИЗОТАХОФОРЕЗ

Обычный электрофорез основан на разделении белков по их подвижности при данном значении pH. Изоэлектрическое фокусирование заключается в том, что создается система с градиентом pH и белки, движущиеся в электрическом поле, достигают в этой системе такой области, в которой значение pH равно их изоэлектрической точке (рис. 5.20). Чтобы создать градиент pH, используют полимерные буферные вещества, которые сами напоминают белки в том отношении, что содержат большое число положительных и отрицательных зарядов и имеют изоэлектрические точки в той же области pH. Эти буферные вещества называются амфолитами. Они так же, как и белки, мигрируют в соответствии с их изоэлектрическими точками и,

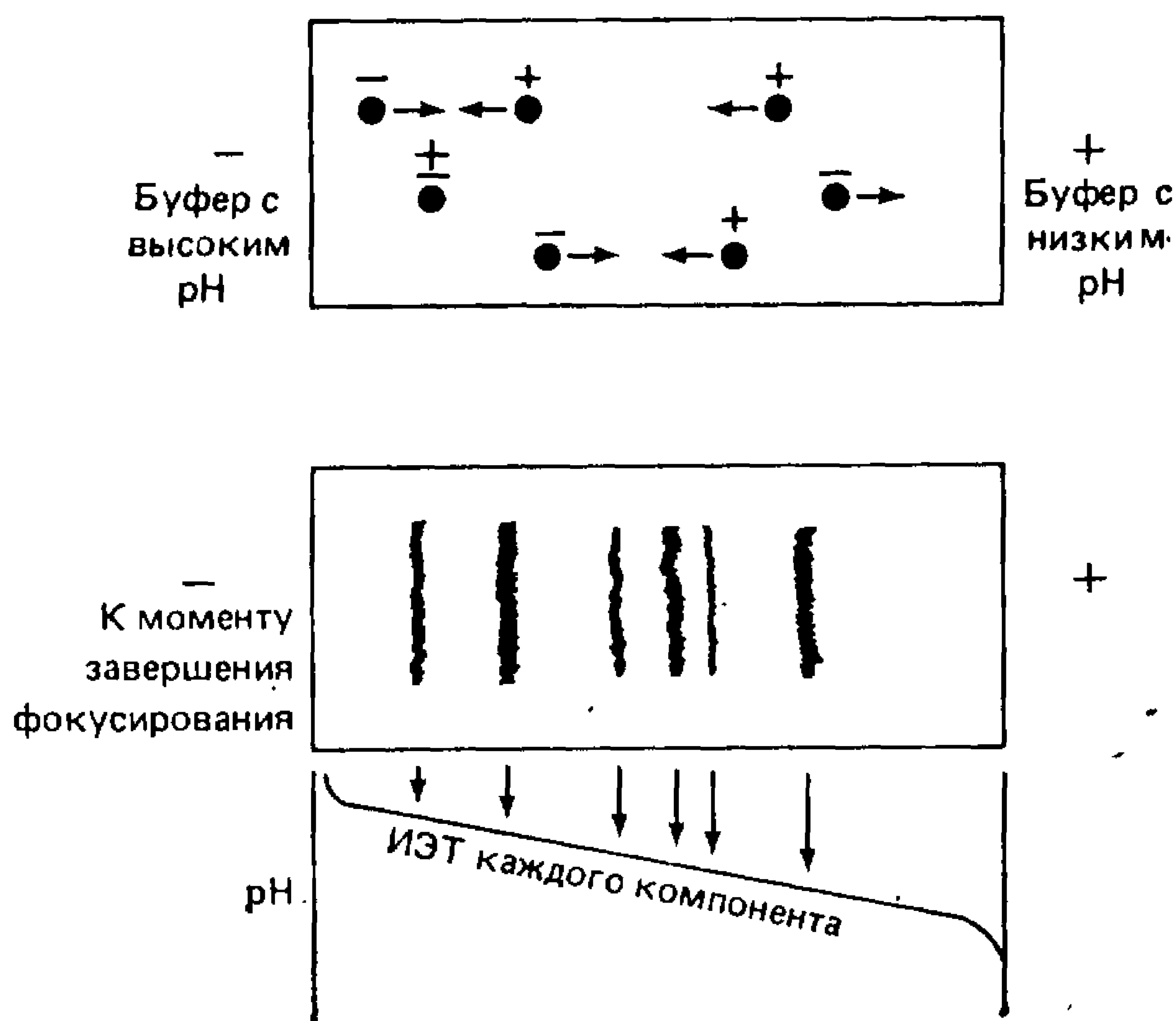


Рис. 5.20. Принципы изоэлектрического фокусирования.

поскольку в смеси присутствуют сотни и даже тысячи различных типов амфолитов, они распределяются вдоль всего блока (или колонки) между местом его соединения с катодом (слабо проводящие основания) и контактом с анодом (слабые кислоты). Таким образом, через несколько часов после наложения электрического поля амфолиты распределяются так, что возникает градиент pH. Интервал значений pH зависит от состава амфолитов (т. е. от интервала значений изоэлектрических точек самих амфолитов). Присутствующие в смеси белки также мигрируют, но, поскольку они обычно больше по размеру, чем амфолиты, требуется больше времени для того, чтобы они достигли положения изоэлектрического равновесия.

Высокая степень разрешения этого метода обусловлена одним важным преимуществом его по сравнению с другими разновидностями электрофореза. Это преимущество отражено в термине «фокусирование». В других методах разделения белков (за исключением изотахофореза — см. ниже) диффузия и перемешивание зон белка возрастают во времени. При изоэлектрическом фокусировании диффузия ограниченна, потому что, как только белковая молекула диффундирует и попадает в зону, отличающуюся по значению pH от ее изоэлектрической точки, она становится заряженной и мигрирует в обратном направлении. По завершении фокусирования теоретически ни один компонент системы не должен двигаться, и потому ток не может проходить (других ионов в системе нет). Следовательно, наложение сильных электрических полей должно приводить лишь к незначительному нагреванию, причем фокусирование будет осуществляться очень быстро. На самом деле слабый ток все же идет, и, если использованное напряжение слишком велико, градиент может исказиться и стать менее четко выраженным.

Изоэлектрическое фокусирование (электрофокусирование) вначале было предложено как препаративный метод. Однако оно получило более широкое распространение как аналитический прием (см. гл. 9). Хотя теоретически, а часто и на практике изоэлектрическое фокусирование — превосходный метод, некоторые связанные с ним трудности ограничивают его применение. Во-первых, это касается конструкции прибора. Изоэлектрическое фокусирование предъявляет менее жесткие требования в этом отношении, чем обычный электрофорез, благодаря почти полному отсутствию тепловыделения. Был разработан целый ряд систем, и некоторые из них оказались удачными. Так, было предложено помещать образец вместе с амфолитами в длинную гибкую трубку, которую можно накрутить в виде спирали на горизонтальную катушку. После разделения индивидуальные компоненты под действием силы тяжести собираются в нижних частях спирали, которая разрезается, и мате-

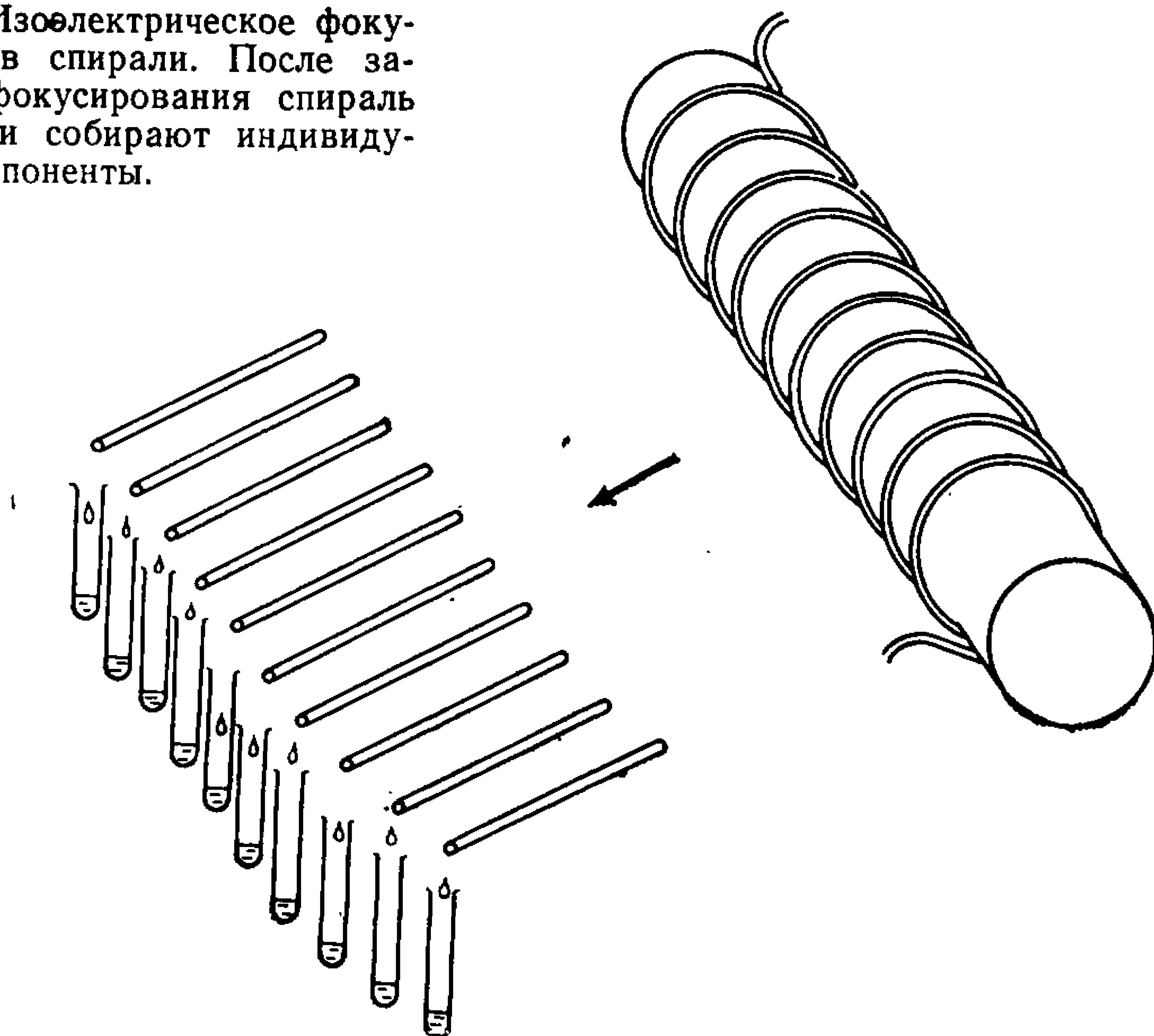


Рис. 5.21. Изоэлектрическое фокусирование в спирали. После завершения фокусирования спираль разрезают и собирают индивидуальные компоненты.

риал из каждого сегмента собирается отдельно (рис. 5.21). Электрофокусирование можно также проводить в горизонтальном блоке, используя, как и в случае обычного горизонтального электрофореза, стабилизаторы типа порошка сефадекса. Однако зоны концентрированного белка получаются при этом гравитационно неустойчивыми, поскольку они имеют бóльшую плотность, чем окружающая их жидкость. Поэтому белок собирается на дне блока и нарушает распределение амфолитов. Простой прибор, использующий гравитационный эффект, основан на применении свободного раствора и рифленых пластинок (рис. 5.22), но этот метод не получил широкого распространения. Основной способ препаративного изоэлектрического фокусирования — это использование вертикальной колоночной системы в приборе, сконструированном для обычного электрофореза. Стабилизация колонки осуществляется, как правило, с помощью градиента сахарозы, но используются и другие способы. Однако мелкопористые гели в этом случае непригодны, так как белки невозможно извлечь из таких гелей — они не выходят из колонки, а остаются в зонах, соответствующих их изоэлектрическим точкам. В качестве стабилизирующей среды можно применять гель с очень крупными порами типа агарозы, если его легко извлечь из колонки, разрезать на диски и вымыть из них белки. Можно даже расплавить мягкий гель агарозы, если только белки стабильны при температуре около 45 °С.

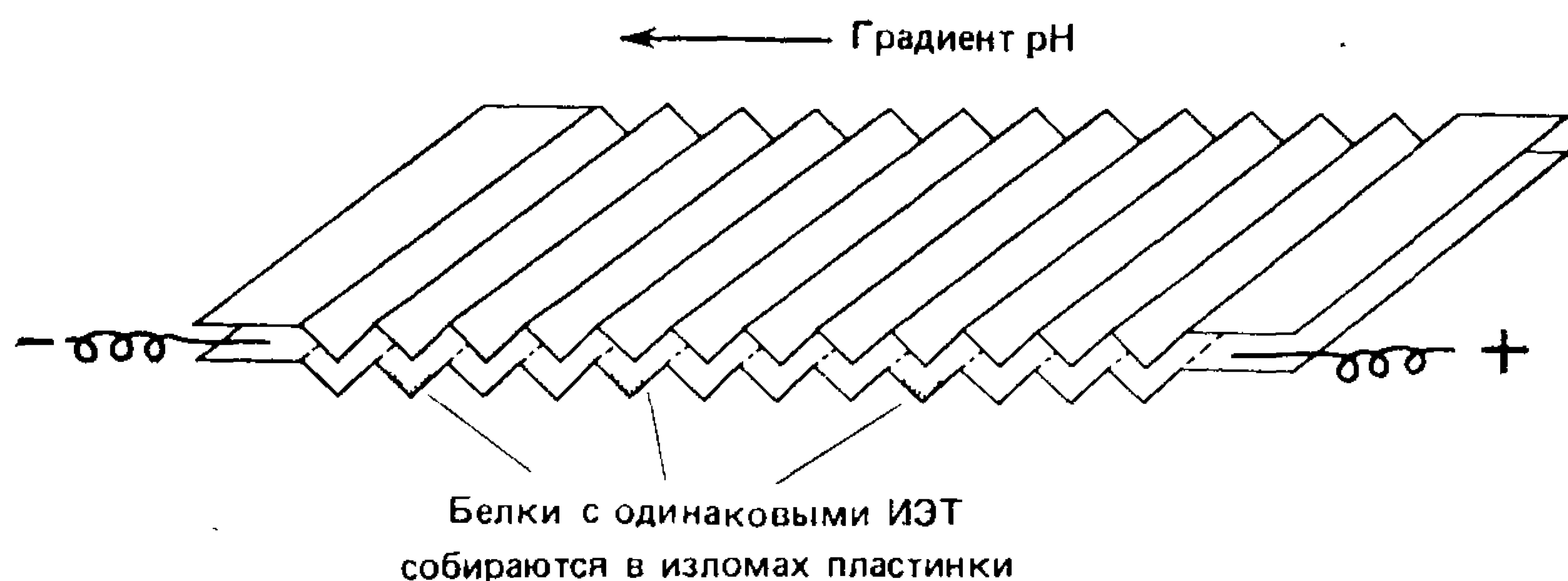


Рис. 5.22. Изоэлектрическое фокусирование в рифленой пластинке [29].

Во-вторых, даже если имеется подходящий прибор, остается проблема, касающаяся свойств нужного фермента в изоэлектрической точке и в меньшей степени свойств сопутствующих белков, присутствующих в препарате. Здесь важны два свойства: 1) фермент должен быть стабилен и 2) он должен быть растворим при нулевой ионной силе. Нельзя предполагать заранее наличие этих свойств у данного фермента. Большинство внутриклеточных ферментов сильно дестабилизируется в области кислых значений pH, и эта область может перекрывать их изоэлектрические точки. Так, если животный белок не может долго сохраняться при pH 6, а его изоэлектрическая точка равна 5,5 (не столь уж низкое значение), то при использовании изоэлектрического фокусирования он будет подвергаться воздействиям pH ниже 6,0 (сходные проблемы возникают при хроматофокусировании — другом методе изоэлектрического фокусирования, см. разд. 4.3). Белки растений и микроорганизмов существуют в природе при более низких значениях pH (и, следовательно, более кислотоустойчивы), но часто они имеют и более низкие изоэлектрические точки, чем белки животных, поэтому в изоэлектрических точках они с равной вероятностью будут неустойчивыми.

Если белок достаточно стабилен при выбранных условиях, следует проанализировать его растворимость. Выпадение белка в осадок в зоне изоэлектрической точки будет нарушать электрическую проводимость в колонке, и осадок может просто осесть на дно. Однако приборы, подобные тому, который показан на рис. 5.22, работают даже лучше, если белок осаждается в его изоэлектрической точке. Следует подчеркнуть, что белок вряд ли будет осаждаться *вблизи* его изоэлектрической точки, а поскольку выпадение в осадок — явление, связанное с растворимостью, достаточно высокая концентрация белка, вызывающая его осаждение, вероятно, будет создаваться только в самой

изоэлектрической точке. Конечно, если осаждается загрязняющий белок, то лучше, чтобы во всей системе существовали условия, препятствующие осаждению.

Основная причина, по которой препаративное изоэлектрическое фокусирование не получило широкого распространения, связана не с теоретическими трудностями, а с соображениями стоимости. Амфолиты, поставляемые фирмой LKB Products (Ampholines) или фирмой Pharmacia (Pharmalites), недешевы, и их частое применение при разработке метода очистки фермента может оказаться тяжелым бременем для бюджета лаборатории. Типичная колонка, на которую можно нанести 100—200 мг белка, должна иметь объем 100 $см^3$, при этом концентрация амфолита составляет 2—4% (вес/объем). Это общее количество необходимого амфолита, так как буферный раствор между колонкой и электродами не содержит амфолита. На анодном конце колонки используется слабая кислота типа $HA = H^+ + A^-$; когда в результате диффузии эта кислота проникает в колонку, происходит ее ионизация вследствие того, что здесь она попадает в условия более высокого значения pH. Образовавшиеся анионы затем перемещаются обратно в процессе электрофореза, протоны же связываются амфолитом, который заряжается положительно и движется в более щелочную область. Здесь он быстро вновь нейтрализуется, отдавая протоны следующему амфолиту. Таким образом возникает слабый ток, и протоны перемещаются от анода к катоду. Точно так же гидроксил-ионы могут двигаться от катода к аноду. Относительный вклад обоих этих ионных потоков в суммарный стационарный ток зависит от области pH используемых амфолитов и от значения pK_a кислоты и основания, присутствующих на обоих концах колонки. В продаже имеются амфолиты с узким и широким интервалами значений pH, и если достаточно точно известна изоэлектрическая точка данного фермента, то следует сначала попробовать амфолиты с узкой областью pH (например, до 2 единиц pH).

Вследствие эффекта фокусирования образец можно вводить в любую точку колонки или даже смешивать с амфолитным буфером при наполнении колонки. Однако последний прием обычно не рекомендуется, так как контакт белка с весьма низкими или высокими значениями pH на концах колонки может привести к его денатурации и осаждению. Обычно верхняя часть колонки служит катодным концом, и образец удобно вводить именно в этом месте (денатурация и осаждение белка в щелочных условиях менее вероятны, чем в кислых), затем на него наслаивают небольшое количество амфолита, перед тем как в эту часть колонки вводят катодный буфер. Следует соблюдать правильную последовательность в наслаивании раство-

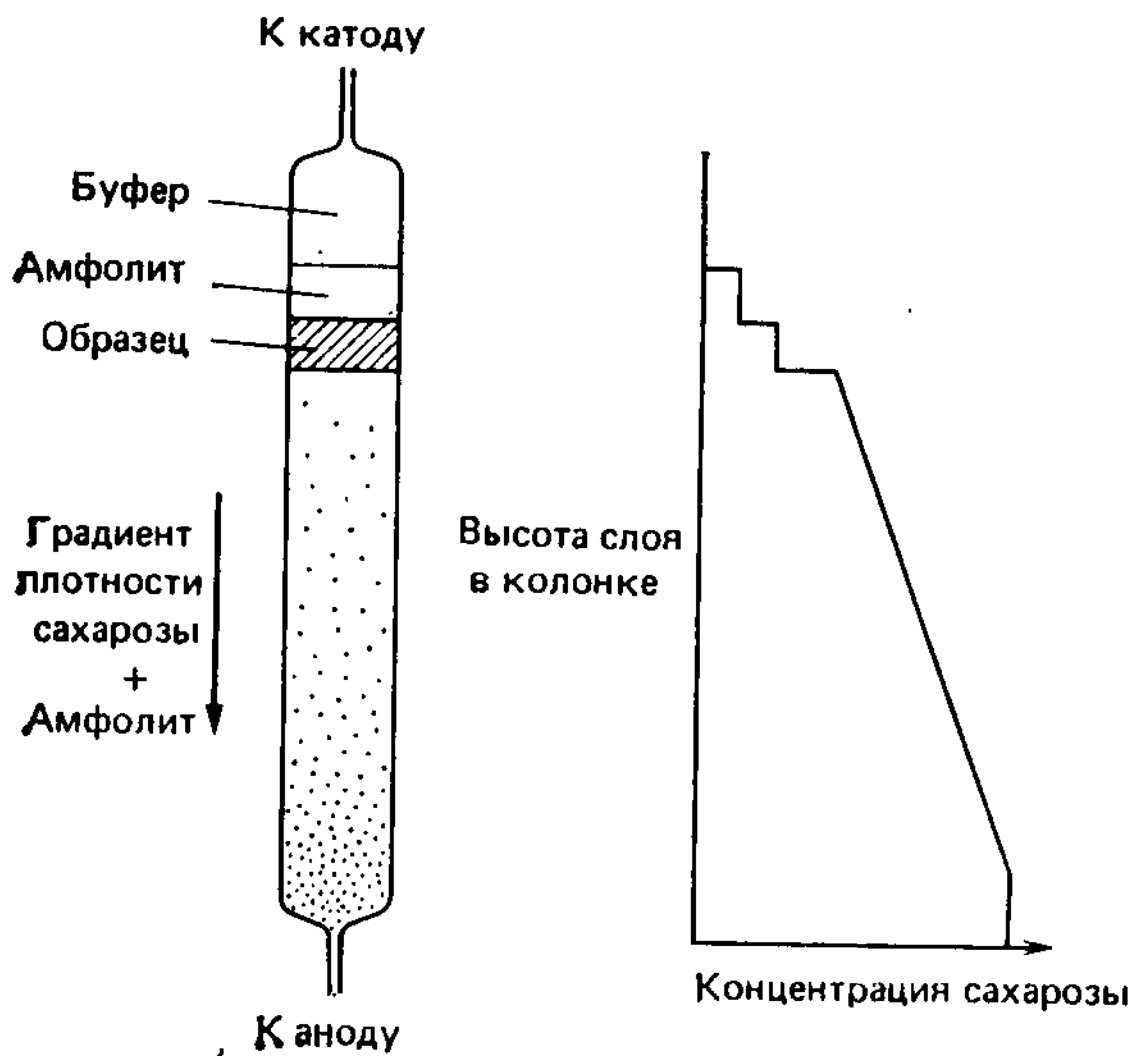


Рис. 5.23. Колонка для изоэлектрического фокусирования, стабилизированная градиентом плотности сахарозы.

ров с разной плотностью. Содержащийся в образце белок будет увеличивать плотность раствора, поэтому к нему следует добавлять меньше сахарозы (рис. 5.23). Даже если стабилизирующая система состоит из порошка, то и в этом случае необходимо в какой-то степени учитывать плотности соответствующих растворов. Добавление сахарозы не повредит системе, при условии что в смеси нет ферментов, катализирующих превращение сахарозы. Как и в случае простого электрофореза, описано множество разных приборов, имеющих каждый свои характеристики и особенности конструкции.

Нет сомнений в том, что при использовании смесей белков, удовлетворяющих критериям их стабильности и растворимости в изоэлектрической точке, изоэлектрическое фокусирование обладает наивысшей разрешающей способностью, хотя этот метод не позволяет разделять белки в зависимости от величины их молекул. Так, если изоэлектрическое фокусирование применяют как решающий аналитический тест для проверки гомогенности полученных препаратов, то часто в предположительно чистых белках обнаруживают много дополнительных небольших полос. Однако известны примеры, когда взаимодействие между белками и амфолитами с очень близкими изоэлектрическими точками приводит к артефактам — появлению нескольких полос. Поскольку амфолиты не проявляют некоего непрерывного набора свойств, а представлены отдельными веществами с близкими, но дискретными изоэлектрическими точками, они также способны фокусироваться, в результате чего образуются полосы

[144]. Если амфолит с изоэлектрической точкой 6,1 сильно взаимодействует с белком, имеющим ИЭТ 6,0, возникает конъюгат с промежуточной ИЭТ. Из-за низкого заряда каждого из этих двух компонентов вблизи pH 6,0 электродвижущие силы оказываются недостаточными, чтобы их разделить. Поэтому белок с ИЭТ 6,0 в составе конъюгата может дать дополнительную полосу вблизи этого значения pH, что будет обусловлено не гетерогенностью белка, а его взаимодействием с дискретными молекулами амфолита. Это явление можно в той или иной степени устранить, если использовать набор амфолитов с бóльшим числом индивидуальных компонентов. В таком случае конъюгаты будут иметь ИЭТ, столь близкие к ИЭТ белков, что дискретные полосы не будут выявляться. Единственным следствием образования конъюгатов будут диффузные полосы белков.

Значительные усилия были затрачены на разработку буферов, содержащих вместо дорогих амфолитов низкомолекулярные вещества с низкой проводимостью, способные образовывать градиент pH [145—147]. Хотя в таких системах удавалось добиться удовлетворительного разделения, разрешение полос из-за более высокой проводимости этих веществ никогда не было столь же впечатляющим, как в случае полимерных амфолитов.

Изотахофорез — это третий метод разделения белков в электрическом поле. Простой электрофорез, осуществляемый в постоянном электрическом поле при постоянном pH, основан на разделении молекул по их истинной подвижности. В методе изоэлектрического фокусирования используется постоянное электрическое поле и градиент pH, что позволяет компонентам смеси двигаться до тех пор, пока они не станут электронейтральными. В методе изотахофореза также создается градиент pH и все компоненты движутся в электрическом поле с одинаковыми скоростями, но напряженность электрического поля в точках локализации каждого компонента различна. Разделение происходит на основе различий в подвижности компонентов (подвижности на единицу напряженности поля), тогда как *истинные* скорости каждого компонента остаются идентичными. Чтобы получить различную напряженность электрического поля в разных точках, не требуется какого-то сложного оборудования для управления градиентом напряжения. Система является самоформирующейся (так же, как и система создáния градиента pH при изоэлектрическом фокусировании), при условии что отсутствует избыток токопроводящих ионов, которые могли бы разрушить границы между компонентами. В отсутствие ионов с промежуточной подвижностью два типа одинаково заряженных ионов, имеющих разную подвижность, будут разделяться до тех пор, пока все ионы, движущиеся быстрее, не ока-

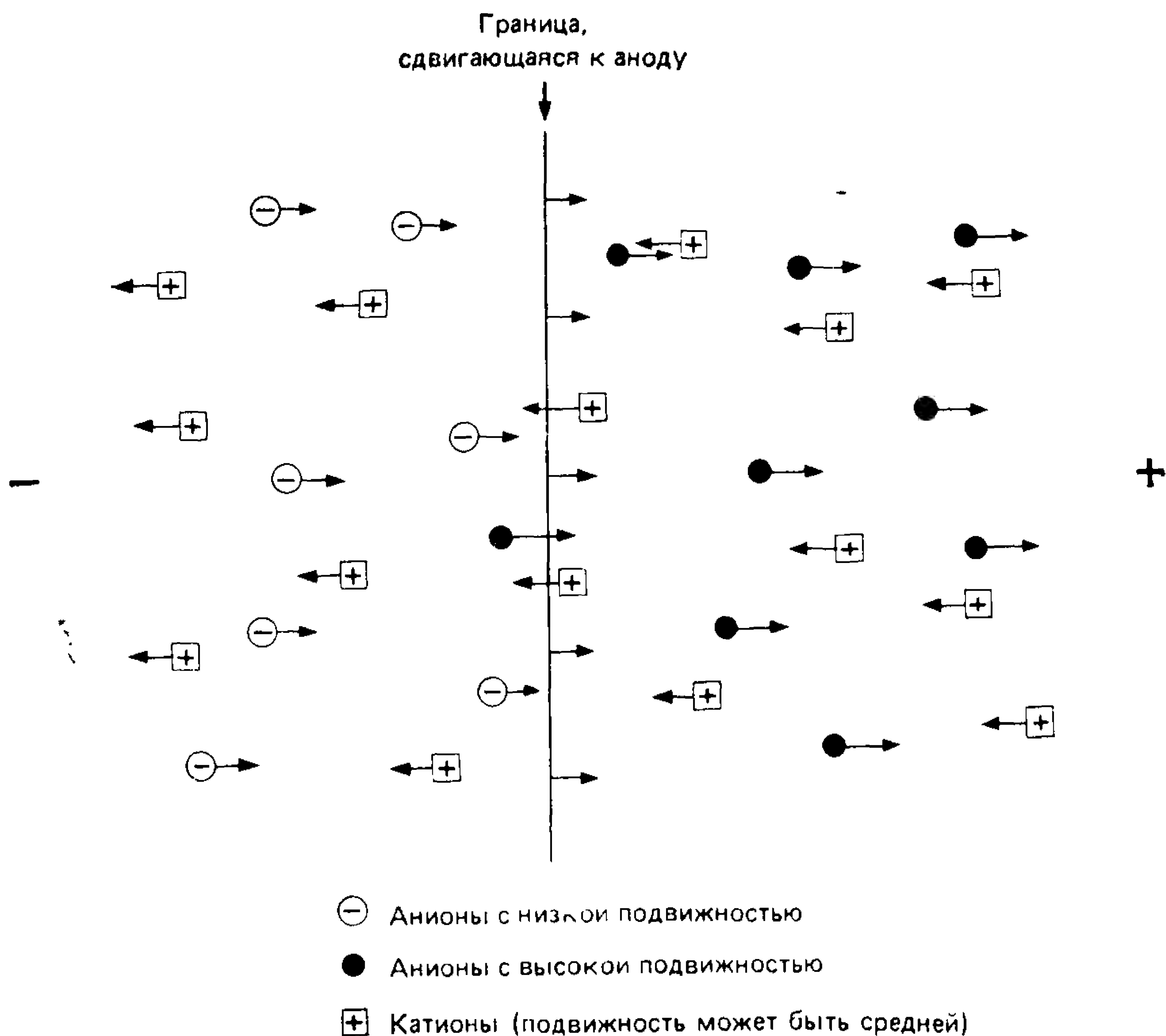


Рис. 5.24. Возникновение дискретных зон Кольрауша в процессе изотахофореза (см. также рис. 5.18, *Б*).

жутся впереди более медленных ионов; в этой точке между ними образуется четкая граница. На самом деле быстрые ионы не могут двигаться впереди медленных так, чтобы между ними возникало пустое пространство, поскольку всегда есть противоионы, перемещающиеся в противоположном направлении через границу, заряд которой должен уравновешиваться при каждом ее положении. В результате возникает резкая дискретность (прерывистость) этих двух зон, которые называются зонами Кольрауша (рис. 5.24).

Если ионы, о которых идет речь, представляют собой белки с разной подвижностью, они располагаются в соответствии с их подвижностью так же, как и все другие ионные компоненты. Обычно pH системы достаточно высок, так что большинство белков заряжены отрицательно и движутся в приложенном электрическом поле к аноду. Лучше доводить раствор белка до нужного pH катионным буфером, например трисом, а

затем диализовать его против разбавленного буфера, содержащего подвижные анионы типа хлорид-ионов. Сначала ток создается хлорид-ионами, которые движутся впереди белка. Единственные анионы, которые остаются позади, — это анионы белков, выстраивающиеся в соответствии с величинами их подвижности. В противоположном направлении ток проводят Н-трис$^+$-ионы, которые присутствуют также в анодном буфере и потому все время возобновляются. Анионный компонент анодного буфера не имеет большого значения, хотя важно помнить, что хлорид-ион не слишком хороший анион для анода, поскольку при этом в качестве продукта электролиза образуется хлор. Предпочтительно, чтобы анионы на аноде выделяли лишь кислород (например, сульфат-, борат- или фосфат-анионы). Однако у катода анионы будут мигрировать в направлении белка, и поэтому следует выбирать такие анионы, которые имеют очень низкую подвижность. В качестве замыкающего буферного аниона используют ε-аминокапроат. Фирма LKB рекомендует 0,23 М ε-аминокапроат; рН доводят до 8,9 трисом. При этом значении рН только около 2% молекул ε-аминокапроата имеет суммарный заряд $[NH_2(CH_2)_5COO^-]$, а остальная их часть находится в цвиттерионной форме и, следовательно, не заряжена. Однако этот анион не только сам по себе имеет низкую подвижность; его эффективная подвижность является средней между его собственной подвижностью и подвижностью незаряженной формы молекулы, т. е. она в 50 раз меньше подвижности самого аниона. Таким образом, этот анион догоняет только белок, имеющий самую низкую подвижность.

Поскольку полосы всех компонентов вынуждены перемещаться с одинаковой скоростью, тогда как подвижность u_i этих компонентов различна, самопроизвольно устанавливается градиент напряжения E_i; именно благодаря этому истинная скорость $(E_i \times u_i)$ движения всех компонентов оказывается одинаковой. Это приводит к тому, что напряжение вдоль изотахофоретической колонки изменяется сложным образом, как показано на рис. 5.25. На границах между компонентами наблюдается резкое падение напряжения, и, поскольку это влияет на концентрацию протонов, промежуточные значения рН также изменяются. В теории изотахофорез осуществляется при постоянном значении рН, если в системе присутствует достаточно сильный буфер. На практике же возникает некоторый градиент рН; белки, обладающие более высокой подвижностью при начальном значении рН, движутся в область более низких значений рН и становятся менее подвижными. Таким образом, саморегулирование подвижностей обусловлено двумя эффектами: разностным градиентом напряжения и градиентом рН, вызывающим снижение подвижности наиболее подвижных компонентов. Ка-

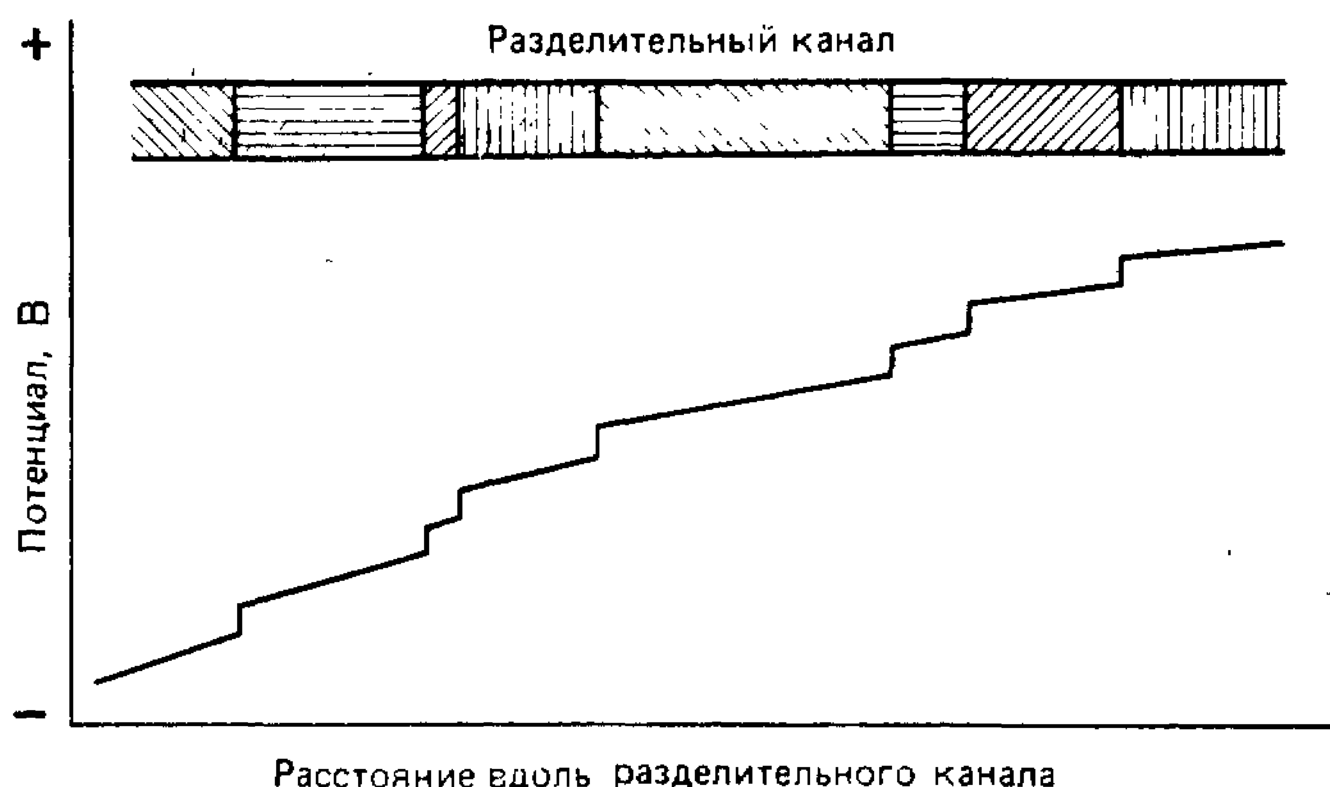


Рис. 5.25. Изменение напряжения вдоль изотахофоретического канала в процессе перемещения компонентов.

кой из них более важен, зависит от условий разделения. С чистыми белками, по-видимому, более важное значение имеет градиент напряжения.

Проводимости белковых молекул настолько низки, что устойчивая граница может существовать лишь при чрезвычайно высоких потенциалах, представляющих к тому же опасность для персонала лаборатории. Чтобы избежать этого, препаративный изотахофорез белков проводят в присутствии амфолитов, которые играют роль «прокладок» (spacers), имеющих промежуточную по сравнению с белковыми компонентами подвижность. Эти «прокладки» увеличивают проводимость и способствуют образованию более устойчивых границ между компонентами. Их присутствие облегчает также создание градиента pH. Таким образом, изотахофорез белков сходен с изоэлектрическим фокусированием, за исключением того, что компоненты в случае изотахофореза продолжают перемещаться (и со временем выходят из колонки), причем индивидуальные компоненты никогда не достигают области, где значения pH соответствуют их изоэлектрическим точкам. Этим способом удается преодолеть три недостатка изоэлектрического фокусирования. Белок способен выходить из канала разделения и может быть собран так же, как и при простом электрофорезе. Неустойчивость белков в их изоэлектрических точках перестает быть проблемой, если сохраняется более высокое значение pH (или более низкое при изменении общего направления потока). Не нужно также опасаться нерастворимости белка в изоэлектрической точке. Основной недостаток этого метода по сравнению с изоэлектрическим фокусированием заключается в том, что он обладает

более низкой разрешающей способностью. Это обусловлено прежде всего тем, что теоретически возможные четкие границы между зонами нельзя сохранить по всей длине колонки вплоть до выхода из нее белковых фракций, а также тем, что амфолиты-прокладки не способны полностью разделить соседние белковые зоны. Изотахофорез имеет еще одно преимущество по сравнению как с обычным электрофорезом, так и с изоэлектрическим фокусированием — это свойственная ему большая емкость, позволяющая обрабатывать довольно значительные количества белка [148]. Кроме того, он не требует большого расхода амфолитов, которые добавляются лишь к исходной белковой смеси в количестве, превышающем по весу количество белка примерно в 2—5 раз.

Из-за сложности аппаратуры и относительно меньшей известности этого метода он используется довольно редко, и в литературе описано очень мало действительно успешных случаев применения препаративного изотахофореза. Однако этот метод обладает многообещающими достоинствами и в будущем, несомненно, получит более широкое распространение.

5.4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ МЕЖДУ ЖИДКИМИ ФАЗАМИ

Этот раздел включен в книгу для полноты картины — распределение белков между различными фазами не является особенно удачным методом разделения, и в этом направлении было сделано очень мало работ. Метод противоточного распределения, весьма популярный метод в органической химии, применялся ранее к некоторым белкам, но с ограниченным успехом. Основная проблема — найти не смешивающийся с водой растворитель (или смешивающийся лишь частично), в котором белок был бы растворим и устойчив. Доступные растворители пригодны лишь для очень небольших полипептидов типа гормонов. В настоящее время имеются двухфазные системы (см. ниже), пригодные для их использования в методе противоточного распределения.

Поскольку лишь немногие белки растворимы (не говоря уж об устойчивости) в органических растворителях, распределение их между жидкими фазами a priori кажется малопригодным методом. Однако добавление в водный раствор некоторых гидрофильных полимеров может привести к разделению фаз и в отсутствие гидрофобных растворителей [149]. В частности, при растворении в воде в подходящих соотношениях декстрана и полиэтиленгликоля возникают две фазы — богатая декстраном и более плотная фаза, осаждающаяся на дно, и всплывающая кверху фаза, насыщенная полиэтиленгликолем. С бóльшим числом полимерных компонентов можно получить большее число

фаз: была описана 18-фазная система [150]. В этих условиях смесь белков распределяется в растворе, и в зависимости от различий в растворимости индивидуальных белков может происходить относительное обогащение одной из фаз каким-либо белком. Разделение фаз осуществляется очень просто: кратковременное центрифугирование позволяет получить четкую границу между фазами, после чего их можно разделить в делительной воронке. Распределение в системе данного компонента смеси обычно не происходит по принципу «все или ничего», и потому выход этого компонента при одностадийной процедуре может быть не очень высоким. Сообщалось о распределении различных белков в трехфазной системе ПЭГ—декстран—фиколл [151], причем было найдено, что важное значение имеет pH системы. Значительно более успешный метод, который, по-видимому, в будущем найдет более широкое применение, — это аффинное распределение. В этом случае одно из растворенных веществ ковалентно связано с лигандом. Фаза, в которой концентрируется это вещество, затем обогащается специфическим по отношению к данному веществу ферментом. Хорошее отделение от примесей было достигнуто при очистке стероидизомеразы путем связывания эстрадиола с полиэтиленгликолем и растворения этого конъюгата вместе с декстраном в препарате неочищенного фермента [152]. Красители цибакрон голубой F3GA и проционовый красный HE-3B, связанные с полиэтиленгликолем, были также успешно использованы для этой цели; особенно удачной была очистка в производственном масштабе глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [153]. Это мягкий и быстрый метод. Хорошая степень очистки достигается, если большая часть примесей уходит в фазу, не содержащую связанного лиганда. С другой стороны, возникают проблемы, связанные с отделением фермента от растворимого комплекса полимер—лиганд, и эта методика вряд ли превосходит по степени разрешения технику аффинной адсорбции. Однако, поскольку она не связана с адсорбцией на твердой фазе, условия оказываются мягче и более пригодными для лабильных белков. В частности, ее можно использовать для разделения фракций частиц, связанных с мембранами. При этом можно применять мутные суспензии.

Одноступенчатое распределение обычно дает неудовлетворительные результаты, если только не происходит крайне неравномерного распределения компонентов между двумя фазами. Если бы можно было совместить распределение между фазами с хроматографией, то стало бы теоретически возможным разделение компонентов смеси с очень близкими коэффициентами разделения. Поначалу казалось, что жидкостно-жидкостная хроматография в этих условиях неосуществима. Однако на

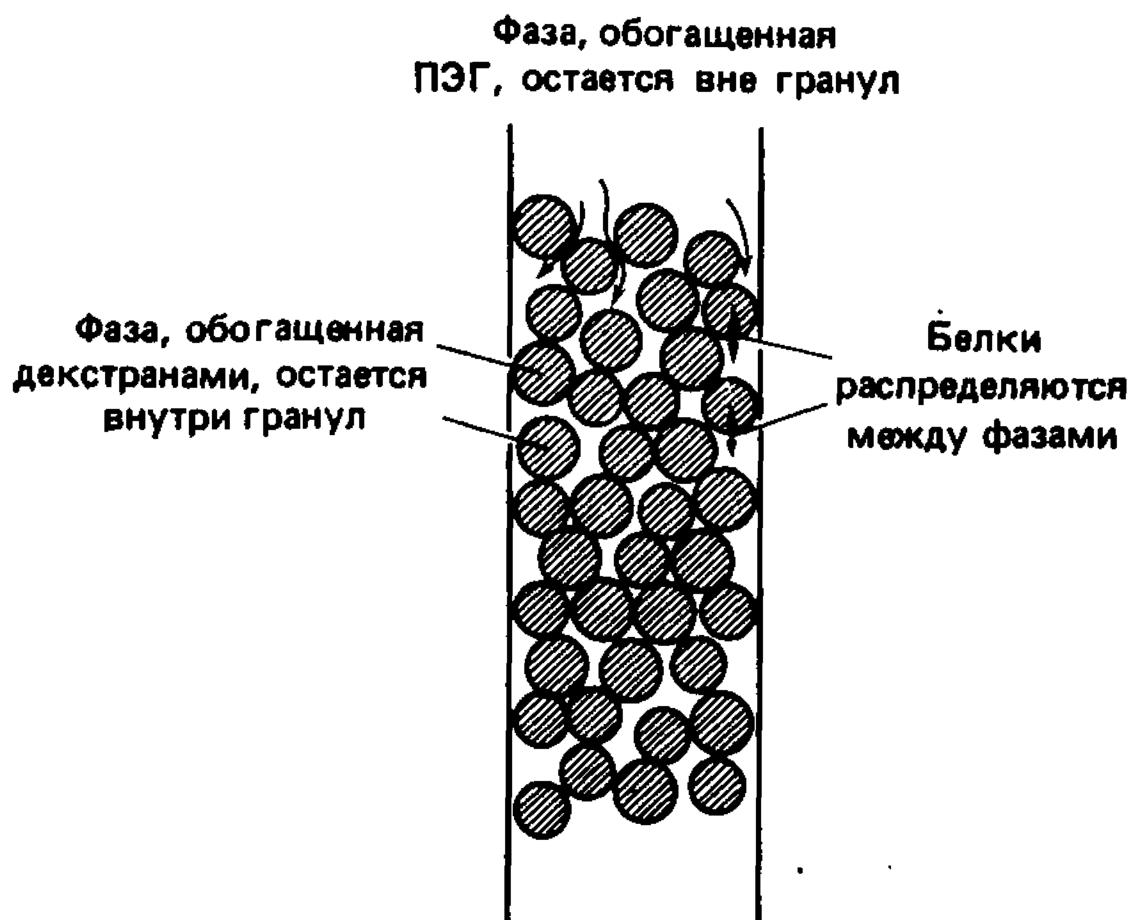


Рис. 5.26. Жидкостно-жидкостная хроматография. Одна жидкая фаза удерживается за счет поверхностного натяжения на поверхности гранул в колонке, а другая фаза подвижна.

самом деле это не так, и ее можно осуществить, если одна из жидких фаз будет иммобилизована. Такой метод оказался успешным при разделении нуклеиновых кислот [154], и нет оснований считать, что его нельзя применить к белкам. Подходящий носитель, подобный шарикам агарозы, уравновешивают с одной из фаз (например, с богатой декстраном фазой), а другую фазу используют как буфер для пропускания ее через колонку (рис. 5.26). Поверхностное натяжение препятствует смешиванию двух компонентов. Обогащенная декстраном фаза остается внутри шариков или непосредственно у их поверхности. В такой колонке возможно простое распределение белков, однако аффинное распределение должно быть даже более эффективным. Система очень сходна с обычной аффинной хроматографией, и единственное различие между ними заключается в том, что связанный лиганд не присоединен ковалентно к твердому носителю, а сохраняет растворимую форму и удерживается между гранулами носителя.

5.5. УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИЯ

Последний метод, о котором будет рассказано в этой главе, — это ультрафильтрация с использованием давления газа для продавливания жидкости через мембрану (см. рис. 1.13, *Б*). Если поры в мембране таковы, что более мелкие молекулы белка проходят через нее с «ультрафильтратом», то достигается разделение белков. Молекулы большего размера удерживаются и концентрируются по отношению к исходному раствору. Поскольку в ультрафильтрационной мембране имеется некоторый

разброс размеров пор, не существует резкой границы пропускания. Часть молекул с размерами, близкими к размерам пор в области пропускания, будет проходить через мембрану, а остальные останутся в исходном растворе. Однако если у нужного белка размер молекул значительно меньше или больше (скажем, по крайней мере на 30—50%), чем установленный верхний предел пропускания, то почти весь белок окажется или в ультрафильтрате, или в «удержанном» растворе.

По своей разделительной способности этот метод, безусловно, хуже, чем гель-фильтрация (основанная на том же принципе — разделении молекул в соответствии с их размерами), так как он позволяет получить только две фракции: «более крупные молекулы» и «более мелкие молекулы». Вместе с тем в некоторых случаях он имеет ряд преимуществ, особенно если

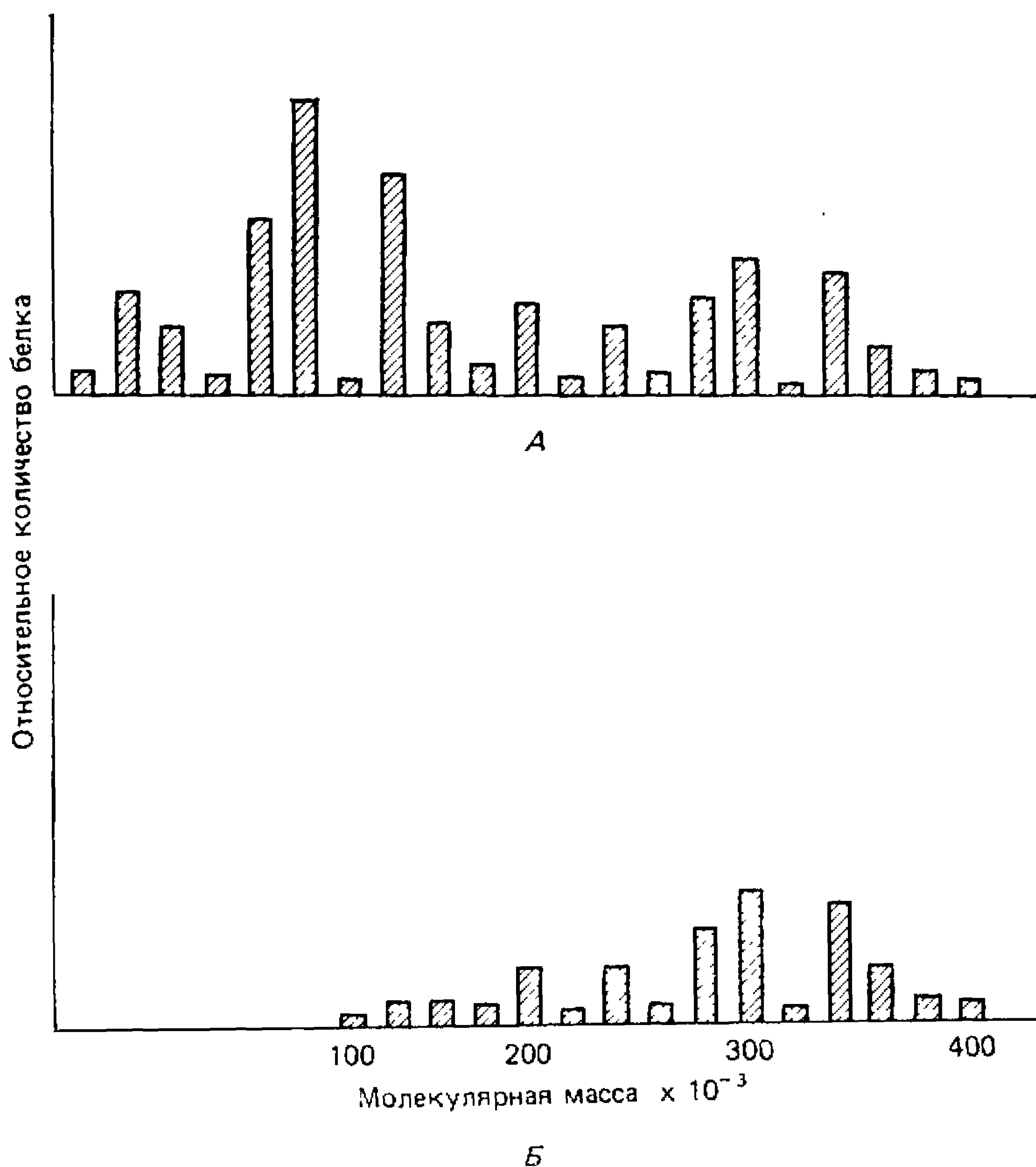


Рис. 5.27. Возможное распределение белков по размерам и количеству до (*А*) и после (*Б*) ультрафильтрации через мембрану с номинальным размером пор 200 000 дальтон (предполагается, что все белки сферические).

получен большой объем разбавленного раствора белка, например раствор, элюированный с адсорбционной колонки. Прежде чем подвергать этот раствор гель-фильтрации, его нужно сконцентрировать. Это можно сделать с помощью ультрафильтрации, причем если выбрать мембрану так, чтобы она задерживала только нужный белок, то отделение белков с молекулами меньших размеров можно осуществить без дополнительных усилий. Ультрафильтрация особенно полезна при очистке белков больших размеров. Предположим, например, что интересующий нас белок имеет мол. массу 300 000, а другие белки распределяются по размерам и количеству, как показано на рис. 5.27, *А*. При использовании мембраны с номинальным «отсекающим» размером пор 200 000 дальтон большая часть белков с мол. массой меньше, чем 150 000, пройдет через мембрану и конечное распределение будет таким, как показано на рис. 5.27, *Б*. В этом примере более половины всего белка удаляется из раствора, что позволяет сконцентрировать «удерживаемый» раствор белка до меньшего объема. С другой стороны, результаты последующей гель-фильтрации будут такими, как если бы более мелкие молекулы белков не были удалены посредством ультрафильтрации. Но так как в растворе теперь содержится меньше белка, можно использовать гель-фильтрующую колонку меньшего размера.

Ультрафильтрация замедляется по мере того, как повышается концентрация белка, поэтому, прежде чем наконец собрать удерживаемый раствор, полезно один или два раза разбавить концентрируемый раствор буфером. Это менее желательно, когда нужный белок находится в ультрафильтрате, так как он уже разбавлен и при добавлении буфера разбавится еще больше. Вторая ультрафильтрация с применением мембраны, имеющей более мелкие поры, может быть использована для концентрирования первого ультрафильтрата.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Fischer L. (1980). Gel filtration chromatography. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work T. S. and Burdon R. H., eds.), vol. 1, Part II, rev. ed., Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Gordon A. H. (1979). Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work T. S. and Burdon R. H., eds.), vol. 1, Part I, rev. ed., Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Pharmacia Fine Chemicals AB Publications (1980). Gel filtration: Theory and practice, Uppsala.

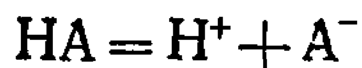
ГЛАВА 6

СОХРАНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В АКТИВНОМ СОСТОЯНИИ

6.1. КОНТРОЛЬ pH: БУФЕРЫ

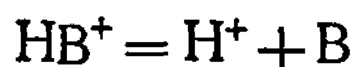
Одно из главных требований, которые должен выполнять экспериментатор при работе с ферментами, — это постоянно следить за величиной pH; важное значение имеет буфер, с помощью которого можно контролировать pH. Необходимо также знать характеристики используемого буфера и иметь под рукой набор различных буферов, чтобы можно было выбрать из них наиболее подходящий. За несколько десятилетий, в течение которых проводилось исследование ферментов, было использовано большое число различных буферов, и до сих пор все еще продолжается разработка новых буферных систем. Полезно знать следующие характеристики используемого буфера: 1) величину pK_a; 2) изменение pK_a с температурой и ионную силу; 3) анионные, катионные или множественные заряды на компонентах буфера; 4) взаимодействие с другими компонентами, например с ионами металлов; 5) растворимость; 6) стоимость; 7) поглощение в УФ-свете.

Буфер сохраняет почти постоянное значение pH, связывая протоны, образующиеся в других реакциях или, наоборот, освобождая их, если они потребляются в каких-то других процессах. Буферное действие раствора оптимально, когда обе эти возможности реализуются в равной степени, но в некоторых случаях, например когда известно, что протоны должны освобождаться, оптимальное буферное действие раствора может проявляться и тогда, когда в избытке имеется оснóвная форма буфера, — это зависит от того, насколько сильным должно быть закисление и какое изменение pH допустимо. Самый простой тип буфера — это тот, в котором одна из форм не заряжена, т. е.



$$HA = H^+ + A^-$$

или



$$HB^+ = H^+ + B$$

Константа диссоциации в первом случае определяется как

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]},$$

а во втором случае как

$$K_a = \frac{[H^+][B]}{[HB^+]}$$

и обычно выражается в логарифмической форме

$$pK_a = -\lg K_a.$$

Таким образом,

$$pK_a = -\log \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} = -\log [H^+] - \log \frac{[A^-]}{[HA]} = pH - \log \frac{[A^-]}{[HA]}.$$

Это уравнение Хендерсона — Хассельбаха, из которого перестановкой можно получить значение pH раствора, содержащего обе формы буфера:

$$pH = pK_a + \lg \frac{[\text{основная форма}]}{[\text{кислотная форма}]}.$$

Данное уравнение применимо к обоим типам буферов — HA и HB^+. Простые расчеты показывают, что $pH = pK_a$, когда [основная форма] = [кислотная форма], $pH = pK_a + 1$, когда [основная форма] = 10×[кислотная форма], и $pH = pK_a - 1$, когда [основная форма] = 0,1×[кислотная форма]. Обычно желательно работать в интервале около 0,5 единицы pK_a, так как в этом случае а) присутствует достаточное количество каждой формы и б) чем ближе значение pH к pK_a, тем меньше изменяется pH в расчете на каждый освобожденный или поглощенный протон.

В приведенных ниже уравнениях используются следующие члены: z — заряд данного компонента буфера и n — величина, равная $2z-1$, где z — заряд кислой формы буфера.

Величина n полезна тем, что указывает на влияние ионной силы на величины pK_a (см. ниже). По определению, n всегда является нечетным числом.

$pK^0_a = -\lg$ (константа кислотной диссоциации), экстраполированный к нулевой ионной силе.

$pK_m = pK_a$, где m — порядковый номер стадии диссоциации, считая от самого низкого значения pH (для многозарядных буферов).

$I =$ ионная сила $= \frac{1}{2} \sum_i C_i (z_i)^2$, где C_i — концентрация заряженных компонентов и z_i — их заряд.

Для простоты допускается, что коэффициенты активности равны единице; при более высоких концентрациях это предположение становится менее оправданным.

Необходимая концентрация буфера в действительности является свойством самой системы, а не буфера, хотя, если приходится работать при крайних значениях в рабочем интервале pH, например в области, отличающейся на одну единицу pH от pK_a, необходимо использовать большее количество буфера для сохранения буферной емкости. Полезно знать, в каком направлении с наибольшей вероятностью может произойти изменение pH, с тем чтобы буфер мог титроваться и противостоять изменению pH — тем сильнее, чем больше это изменение. Например, предположим, что нам нужен раствор с pH 6,5 и максимальным буферным действием при низкой ионной силе, устойчивый к закислению. Может подойти имидазольный буфер, но, так как его pK_a равно 7,0, закисление раствора ниже pH 6,5 будет сопровождаться снижением его емкости. В то же время при использовании гистидина (pK_a 6,0) буфер будет дотитровываться в процессе закисления и по мере приближения pH к величине pK_a емкость буфера будет увеличиваться. С другой стороны, если необходимо, чтобы буфер был анионным, наиболее подходящим в этом случае будет *N*-морфолиноэтансульфонат (МЭС, pK_a 6,2).

Многие буферы, применявшиеся в прошлом, теперь используются реже, поскольку существуют другие, более подходящие буферные системы. К таким выходящим из употребления буферам относятся малеат, pK_a 6,3 (обычно в форме трис-малеата, который охватывает большой диапазон pH, хотя и со слабым действием около pH 7,0), так как он поглощает в УФ-свете и имеет $n = -3$ (см. ниже); барбитон, pK_a 8,0 (поглощает в УФ-свете и токсичен; известен также как веронал); глицилглицин, pK_a 8,2 (трицин имеет значительно лучшие характеристики и дешевле); какодилат, pK_a 6,2 (токсичный и дорогостоящий) и лимонная кислота, pK_2 4,8, pK_3 6,4 (связывается с некоторыми белками, образует комплексы с металлами и имеет значение $n = -3$ или -5).

Для буфера уксусная кислота/ацетат кислотным буферным компонентом служит CH_3COOH, у которой $z = 0$ и $n = -1$. В лимонной кислоте (pK_3) роль кислотного компонента играет цитрат$^{2-}$ ($z = -2$, $n = -5$), а в трис-буфере — Н-трис$^+$ ($z = +1$, $n = +1$).

Влияние температуры и ионной силы на величины pK_a

Для данной концентрации буфера ионная сила тем выше, чем больше $[n]$ превосходит единицу. Наиболее существенно то, что n является важным показателем влияния ионной силы на величину pK_a. Параметр n входит в упрощенное уравнение

Таблица 6.1. Влияние ионной силы на pK_a некоторых типичных буферных растворов[1]

	n	pK^0_a	pK_a, $I=0{,}01$	pK_a, $I=0{,}1$	Концентрация компонентов буфера при $pH=pK_a$, когда $I=0{,}1$ целиком определяется буфером
Ацетат	—1	4,76	4,72	4,66	0,2
Фосфат	—3	7,20	7,08	6,89	0,05
Цитрат	—5	6,40	6,29	5,88	0,022
Трис	+1	8,06	8,10	8,16	0,2

[1] Теоретически вычислено из уравнения (6.1) при 25 °С.

Дебая — Хюккеля, связывающее значения pK_a и pK^0_a ($I=0$):

$$pK_a = pK_a^0 + \frac{0{,}51nI^{1/2}}{1+1{,}6I^{1/2}} \text{ (при 25 °C)}. \qquad (6.1)$$

Таким образом, величины n, превышающие единицу, приводят к большему влиянию ионной силы на pK_a; это особенно характерно для цитрата (табл. 6.1), у которого $n=-5$ в области pH, где обычно используется цитрат. Следует отметить, что для катионных буферов, таких, как трис, pK_a повышается с увеличением ионной силы. Влияние ионной силы следует учитывать при приготовлении исходных буферных растворов более высокой концентрации по сравнению с концентрацией используемых буферов.

Температура также влияет на значения pK_a, особенно в случае буферов, содержащих амины. О влиянии температуры на буферное действие можно судить по термодинамическим выражениям

$$\frac{d\ln K_a}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}, \qquad \frac{d\,pK_a}{dT} = -\frac{\Delta H^0}{2{,}3RT^2}$$

и

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 = -RT\ln K_a = 2{,}3RT\,pK_a.$$

Следовательно, для буферов с высоким значением pK_a величина ΔG^0 имеет большое и положительное значение. В зависимости от энтропии диссоциации ΔH^0 также обычно имеет высокое и положительное значение. Таким образом, степень изменения pK_a с температурой, вероятнее всего, уменьшается, и тем сильнее, чем больше значение pK_a. С другой стороны, буферы с низким pK_a меньше изменяются с температурой. Энтропия диссоциации очень мала для аминсодержащих буферов, которые широко используются при значениях pH выше 6, что объясняется

Таблица 6.2. Термодинамические величины для некоторых буферов[1]

	n	pK_a^0	dpK_a/dT при 25 °С	ΔH^0 (кДж·моль$^{-1}$)	ΔG^0 (кДж·моль$^{-1}$)	ΔS^0, Дж·град$^{-1}$·моль$^{-1}$
Фосфорная кислота, pK_1	—1	2,15	+0,004	—6,8	12,3	—64
Уксусная кислота	—1	4,76	—0,0002	0,3	27,3	—90
Лимонная кислота, pK_3	—5	6,40	0	0	36,6	—123
Имидазол	+1	6,95	—0,020	34,0	39,9	—19
Фосфорная кислота, pK_2	—3	7,20	—0,0028	4,8	41,3	—12
ТЭС	—1	7,50	—0,020	34,0	43,0	—30
Трис	+1	8,06	—0,028	48,0	46,2	6
Аммиак	+1	9,25	—0,031	53,0	53,1	0
Карбонат	—3	10,33	—0,009	15,4	59,3	—147

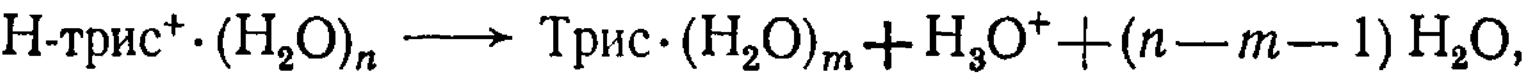
[1]) Значения ΔH^0, ΔG^0 и ΔS^0 были вычислены из значений pK_a и dpK_a/dT, которые были взяты из работ [51, 52].

тем, что при диссоциации буфера с $n=+1$ новые заряженные ионы не образуются. Например, в случае триса



$$\text{Н-трис}^+ \longrightarrow \text{Трис} + H^+ \quad \Delta S^0 = 5{,}7 \text{ Дж·град}^{-1}\text{·моль}^{-1}.$$

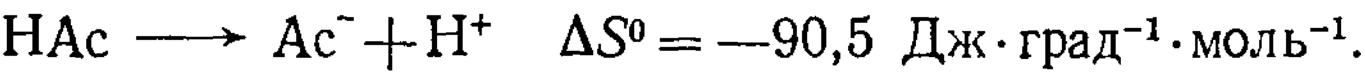
Изменение энтропии зависит главным образом от степени участия молекул воды в гидратации компонентов буфера; небольшое положительное значение ΔS^0 для триса (табл. 6.2) указывает, что протонированный компонент гидратирован, вероятно, немного больше, чем нейтральная форма:



$$\text{Н-трис}^+\cdot(H_2O)_n \longrightarrow \text{Трис}\cdot(H_2O)_m + H_3O^+ + (n-m-1)\,H_2O,$$

где $n \gg (m-1)$.

С другой стороны, если буфер имеет $n=-1$, то образуются два новых, ранее не существовавших иона; например, в случае уксусной кислоты



$$\text{HAc} \longrightarrow \text{Ac}^- + H^+ \quad \Delta S^0 = -90{,}5 \text{ Дж·град}^{-1}\text{·моль}^{-1}.$$

Можно допустить, что если ион ацетата гидратирован в большей степени, чем нейтральная кислота, то некоторые молекулы воды при ионизации становятся «более упорядоченными», и в результате происходит значительное уменьшение энтропии (она приобретает высокое отрицательное значение):



$$(n-m+1)\,H_2O + \text{HAc}\cdot(H_2O)_m \longrightarrow H_3O^+ + \text{Ac}^-\cdot(H_2O)_n,$$

где $n > m$.

Подобные соображения можно привести и для буферов с $n=-3$ и $n=-5$; в этих случаях чем больше заряжен ион, тем

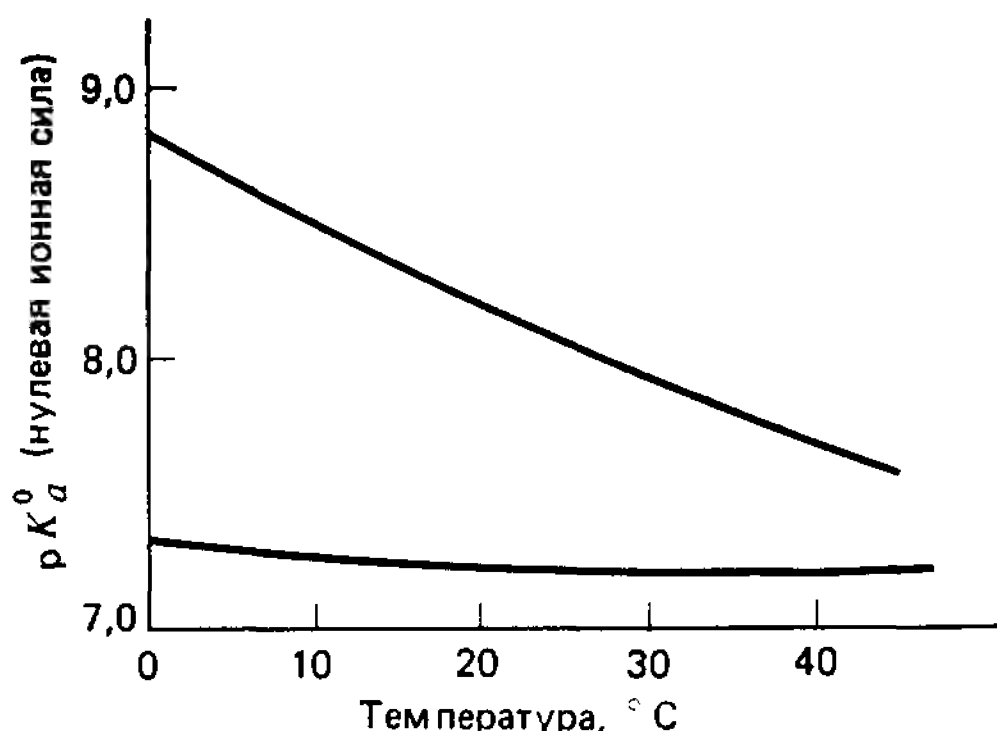


Рис. 6.1. Изменение pK_a в зависимости от температуры для фосфата (нижняя линия) и триса (верхняя линия). Обратите внимание, что температура оказывает лишь незначительное влияние на фосфат, но сильно влияет на трис.

больше он гидратируется. По тем же причинам цвиттерионы, буферное действие которых проявляется при более высоких значениях pH (из-за диссоциации протонированной аминогруппы), несколько менее чувствительны к температуре, чем сильные амины; они имеют $n = -1$, а не $n = +1$, но их нейтральная форма, вероятно, хорошо гидратируется, так как она несет как отрицательные, так и положительные заряды, что приводит к промежуточной величине ΔS^0. Например, в случае ТЭС



$$\text{ТЭС}^{\pm} \longrightarrow \text{ТЭС}^{-} + H^{+} \quad \Delta S^0 = -30 \text{ Дж} \cdot \text{град}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}.$$

На рис. 6.1 и 6.2 показаны изменения значений pK_a для фосфата (pK_2) и триса в зависимости от температуры и ионной силы. Характерно, что pK_a триса изменяется на одну единицу pH при изменении температуры от 4 до 37 °С — традиционные для биохимиков температуры.

В табл. 6.3 перечислены используемые буферы и указаны их свойства. Более подробные таблицы можно найти в работах

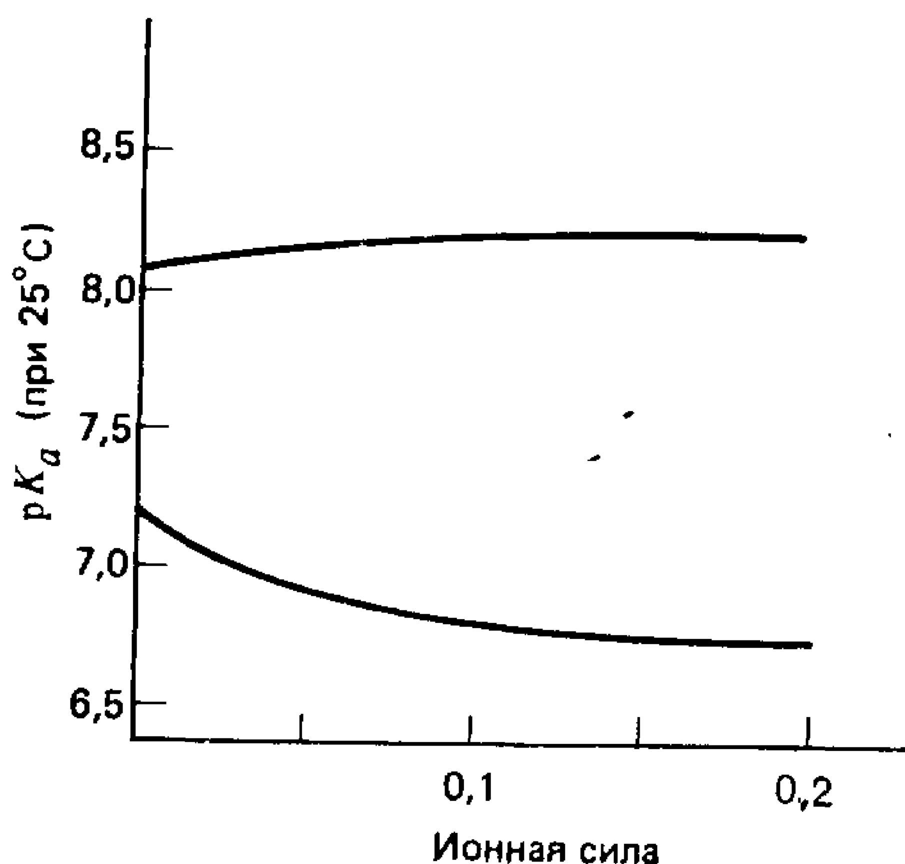


Рис. 6.2. Влияние ионной силы на pK_a фосфата (нижняя кривая) и триса (верхняя кривая). Влияние на фосфат в три раза сильнее, чем на трис (в соответствии с отношением значений n), и имеет противоположную направленность (так как n для фосфата отрицательно, а для триса положительно).

Таблица 6.3. Набор необходимых буферов

Название	n	pK^0_a (25 °С)	Примечание
Молочная кислота	—1	3,86	
Уксусная кислота	—1	4,76	
Пивалиновая кислота (триметилуксусная кислота)	—1	5,03	Не очень растворима; неприятный запах
Пиридин	+1	5,23	Летуч, ядовит
Пиколиновая кислота	—1*	5,4	Сильно поглощает в УФ-свете
Янтарная кислота	—3	5,64	
Гистидин	+1*	6,0	Образует прочные комплексы с Me^{2+}
N-Морфолиноэтансульфокислота (МЭС)	—1*	6,15	
Бис(2-гидроксиэтил)имино-трис(гидроксиметил)метан(бис-трис)	+1	6,5	
N-(2-ацетамидо)-2-аминоэтансульфокислота (АЦЭС)	—1*	6,9	
Имидазол	+1	6,95	Образует комплексы с Me^{2+}
Фосфат	—3	7,20	Стабилизирует многие ферменты
N-Морфолинопропансульфокислота (МОПС)	—1*	7,2	
N-Трис(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфокислота (ТЭС)	—1*	7,5	
Триэтаноламин	+1	7,75	
Трис(гидроксиметил)аминометан(трис)	+1	8,06	
N-Трис(гидроксиметил)метилглицин (трицин)	—1*	8,15	
Трис(гидроксиметил)аминопропансульфокислота (ТАПС)	—1*	8,4	
2-Амино-2-метил-1,3-пропандиол	+1	8,8	
Диэтаноламин	+1	8,9	
Таурин	—1*	9,1	
Аммиак	+1	9,25	Летуч
Борная кислота	—1	9,23	Образует комплексы со многими углеводами
Этаноламин	+1	9,5	
Глицин	—1*	9,8	
1-Аминопропан-3-ол	+1	9,95	
Карбонат	—3	10,3	

* Цвиттерионный буфер в кислотной или оснóвной форме.

[50, 51]. Идеальная серия буферов состояла бы из двух наборов, один с $n=-1$, а другой с $n=+1$. Рекомендуемые буферы для ионообменной хроматографии перечислены в табл. 4.6. Единственные пробелы, которые в настоящее время нельзя практически заполнить из-за отсутствия соответствующих бу-

феров, следующие: а) буфер с $n=-1$ и рK_a около 5,5, который не поглощает в УФ-диапазоне спектра; б) буфер с $n=+1$ и рK_a около 5,5, который не испаряется и не поглощает в УФ-области; в) буфер с $n=+1$ и рK_a около 6,0, который не образует комплексы с ионами металлов.

Приготовление буферных растворов

Чтобы приготовить буферный раствор, взвешивают соответствующие количества каждой формы буфера, навески растворяют в воде и смесь доводят до нужного объема. Однако, чтобы избежать возможной ошибки, рекомендуется всегда проверять pH с помощью pH-метра, особенно если необходимо использовать добавки, например ЭДТА, меркаптоэтанол или хлористый магний. Некоторые компоненты буфера нельзя считать полностью безводными, поэтому для установления точных значений pH, особенно на границах той области pH, где раствор проявляет буферное действие, pH приготовленного раствора следует проверить на pH-метре. Ионная сила важна не только потому, что она влияет на значения рK_a, но и потому, что ее изменение играет существенную роль в других методах, таких, как ионный обмен.

Ионная сила буфера зависит от способа его приготовления. Например, 20 мM триэтаноламиновый буфер с pH 7,5 можно приготовить из 20 мM триэтаноламина, доведя его pH до 7,5 с помощью HCl; ионная сила этого буфера равна 0,012 (отношение кислотной к осно́вной форме составляет 12 : 8 при pH 7,5); единственные ионы, присутствующие в буфере, — это H-триэтаноламин$^+$ и Cl^-. Этот буфер можно приготовить иначе — добавив к 20 мM хлористому триэтаноламину NaOH до pH 7,5; тогда $I=0{,}020$, так как в смеси будет присутствовать 8 мM NaCl. Кроме того, pH триэтаноламина можно довести до нужного значения серной кислотой. Тогда сульфат-ионы с зарядом, равным двум, тоже будут вносить большой вклад в ионную силу; в данном случае $I=0{,}018$. Авторы редко дают подробное описание процедуры приготовления буферных растворов (в том числе и данные о температуре); к счастью, это не всегда нужно. Концентрации используемых буферов довольно произвольны; не следует считать, что если описанный буфер имел 20 мM концентрацию, то 21 мM буфер будет непригоден для работы. Не надо тратить время, отвешивая буферные соли с точностью до 5 или 6 знаков. Даже небольшие отклонения в содержании воды сделают такую точность бесполезной. Если нет специальных указаний, то обычно для доведения pH буферного раствора до нужной величины используют HCl, чтобы снизить pH, и NaOH

или КОН, чтобы повысить pH. Для достижения максимальной буферной емкости при данной ионной силе необходимо выполнить следующие требования: 1) подобрать буфер с pK_a в пределах 0,5 единицы необходимого pH и с величиной n, равной +1 или —1; 2) использовать незаряженную форму буфера и повысить значение pH, если $n = -1$, или снизить его, если $n = +1$; 3) использовать два буфера, один из которых имеет $n = -1$ и pK_a на 0,5—1 единицу выше, чем pK_a другого, у которого $n = +1$. Смешайте обе незаряженные формы до достижения соответствующей величины pH. При этом можно добиться абсолютного максимума буферной емкости.

В случае 3, возможно, будет трудно определить ионную силу, особенно если между заряженными формами буферов наблюдаются сильные взаимодействия, но проводимость таких смесей обычно очень низка. Буферы подобного типа широко используются для электрофореза (см. разд. 5.2), например трисборат (pH 8—9) и имидазол-МОПС (pH 6,8—7,5), так как они имеют низкую ионную силу. Все эти ионы являются буферами, причем ионы большого радиуса отличаются низкой проводимостью.

Полезно иметь ряд исходных буферных растворов, концентрация которых в 10 или даже в 100 раз больше, чем концентрация приготовляемых из них буферов, непосредственно используемых в опыте. Преимущества таких концентрированных буферных растворов заключаются в том, что при хранении они занимают мало места; бактерицидные добавки (например, азид) разбавляются при последующем использовании буфера; буфер можно добавить к не содержащему буфера белковому раствору, не подвергая последний действию крайних значений pH. Но следует помнить, что при разбавлении pH изменяется (рис. 6.2, табл. 6.1).

Часто возникает необходимость регулировать pH белкового раствора. Рассмотрим две ситуации. Первая, когда требуется лишь незначительное доведение pH раствора до значения, находящегося в области pH буферного действия уже присутствующих в растворе солей буфера. В этом случае можно использовать разбавленную слабую кислоту (например, уксусную кислоту с концентрацией не более 1 *М*) или основание (трис, 1 *М*); раствор необходимо хорошо перемешивать, чтобы локализованные области кислоты или щелочи вокруг капель добавляемого раствора быстро рассеивались. Только тогда, когда величины pH ниже 5 или выше 8, может потребоваться несколько более сильная кислота или основание. Если же наблюдается существенное отклонение pH от нужного значения и в растворе присутствует сильный буфер, можно использовать более концентрированную кислоту (или основание), с тем чтобы не до-

пустить слишком большого увеличения объема. Чтобы избежать локальных изменений pH до экстремальных значений, добавляемый раствор сам может быть частично нейтрализован. При использовании 5 М уксусной кислоты, pH 4,5 (NaOH), в качестве концентрированного pH-понижающего раствора ферментная смесь ни в одной своей части не подвергается действию более низких pH, чем 4,5. Для повышения величины pH можно использовать 5 М аммиак, pH 9,5 (HCl).

Вторая ситуация наблюдается тогда, когда конечное значение pH находится за пределами области буферного действия первоначально присутствовавших солей. К раствору можно добавить подходящие буферы еще до доведения pH до нужного значения, но обычно лучше использовать pH-регулирующий раствор, который сам образует буфер, когда pH достигнет желаемого значения. Например, если имеется раствор трис-хлорида с pH 8 и нужно изменить его pH до 6,5, то при использовании кислотной формы какого-либо буфера с pK_a в пределах 6,2—6,8 pH понизится и раствор останется буферным. В данном примере можно использовать 1 М МЭС (кислота) или, если необходим буфер типа $n=+1$, 1 М гистидин-хлорид.

Если при доведении pH требуется большая точность, то температура во время приготовления буфера может иметь очень существенное значение. Часто в описаниях методов очистки ферментов констатируется, что «все процедуры выполнялись при 4 °С»; между тем, вероятнее всего, используемые буферы смешивались при комнатной температуре, так что истинное значение pH при 4 °С было совсем другим. Большинство pH-метров имеет устройство для температурной компенсации, но это не означает, что если прибор установлен на 4°, а работа проводится при 25 °С, то будет сделана правильная компенсация — прибор ведь не может знать, какая величина dpK_a/dT соответствует данному раствору. Для приготовления буфера при 4 °С (обычная температура холодной комнаты) необходимо установить компенсатор температуры на 4 °С, поместить электрод в стандартный буфер *при 4 °С*, дать ему охладиться до этой температуры и снять показания прибора при стандартной величине 4 °С. Затем нужно довести буфер, белковый раствор или другой рабочий раствор до желаемой величины pH *при 4 °С*. В некоторых методах, использующих изоэлектрическое осаждение в присутствии холодного органического растворителя, pH следует доводить при температуре +2 °С и его величина должна быть установлена с точностью ±0,1 единицы. Единственно надежный способ выполнить эти условия — поступить так, как описано выше. Между прочим, изменение pH в присутствии органического растворителя — это еще один фактор, влияющий на величины pK_a (см. разд. 3.4).

В данном разделе при рассмотрении буферов мы исходим из предположения, что значение pH в любой момент может быть измерено правильно и точно. Современные pH-метры просты в обращении и надежны в смысле точности, особенно если они снабжены цифровым табло. Тем не менее им свойственны определенные недостатки, проявляющиеся чаще всего при работе с обычным комбинированным стеклянным электродом. Даже если все инструкции выполняются пунктуально, показания могут быть неправильными из-за плохой проводимости и возникновения скачка потенциала на границе жидкости и керамического держателя между измеряемым образцом и раствором KCl внутри электрода. Иллингворт [155] недавно исследовал это явление и обнаружил, что многие широко используемые и некоторые новые комбинированные электроды дают отклонения величины pH до 0,4 единицы при работе с буферами, имеющими ионную силу, значительно отличающуюся от ионной силы буфера, применяемого для калибровки pH-метра. Мы рекомендуем проверить ваш pH-метр. Для этого установите pH по 50 мМ фосфатному буферу, а затем разведите этот буфер в 10 раз; значение pH должно стать на 0,2 единицы выше (см. рис. 6.2). Если этого не произойдет, то следует осмотреть керамический держатель и *осторожно* протереть его поверхность, чтобы снять всякий налет. В промежутках между измерениями электрод лучше всего держать в крепком растворе KCl.

В заключение следует отметить, что всегда нужно знать точное значение pH. Если в методе не указываются величины pH — измерьте их сами; различия в результатах, получаемых при использовании того или иного метода, могут быть обусловлены различными значениями pH исходного сырья. Если у вас нет применяемого в данном методе буфера, то надо подумать, имеет ли он какое-то особое значение, или его можно заменить другим буфером со сходными характеристиками.

6.2. СТАБИЛИЗИРУЮЩИЕ ФАКТОРЫ ДЛЯ ФЕРМЕНТОВ

С тех пор как биохимики начали заниматься очисткой ферментов, они мучаются над решением проблем, связанных с потерей ферментативной активности. Общая причина такого явления заключается в том, что ферменты часто представляют собой лабильные белковые молекулы, которые при освобождении из своего природного защитного окружения подвергаются различным воздействиям, которым они не могут противостоять. Внеклеточные ферменты составляют исключение по той простой причине, что они предназначены самой природой функционировать в менее благоприятном окружении. Именно поэтому многие успехи, достигнутые в первых работах по очистке белков и

определению их структуры, были получены с внеклеточными ферментами, которые обычно представляют собой небольшие жесткие белковые молекулы. Часто их содержание во внеклеточной жидкости составляет значительную долю общего количества белка. Естественная среда внутри клетки сильно отличается от внеклеточной. Растворимые белки, как цитоплазматические, так и локализованные внутри органелл, находятся в очень концентрированном белковом «бульоне» (обычно не менее 100 мг·мл$^{-1}$), а в митохондриальном матриксе их содержание доходит до 400 мг·мл$^{-1}$ [24]. Как правило, в клетке наблюдается относительно низкое напряжение O_2 (в некоторых случаях оно равно нулю), и в ней присутствуют различные восстанавливающие соединения, такие, как глутатион, поддерживающие высокий восстановительный потенциал. В клетке содержатся также в достаточно больших количествах метаболиты, способные стабилизировать ферменты. Как только ткань разрушена, белки освобождаются из своего защитного окружения, растворяются в экстрагирующем буфере, который может быть полностью насыщен кислородом. Освобождаются также и протеолитические ферменты, находившиеся в изолированных лизосомных компартментах внутри клетки. Ферменты подвергаются воздействиям трех типов, которые могут привести к потере активности: 1) денатурации, 2) инактивации каталитического центра и 3) протеолизу.

Инактивация каталитического центра может быть обусловлена утратой кофакторов и диссоциирующих простетических групп, а также химическими изменениями аминокислотных остатков в активном центре.

Денатурация

Денатурация белка может быть сведена к минимуму, если исключить основные денатурирующие факторы. К ним относятся крайние значения pH и температур, а также такие денатуранты, как органические растворители (см. разд. 3.5). Естественная величина pH внутри клетки обычно находится в пределах 6—8, поэтому буферы, pH которых лежит в этой области или очень близок к фактическому значению в данной ткани, должны защищать ферменты от денатурации под действием крайних значений pH. Следует отметить, что физиологическое значение pH в большинстве животных клеток составляет 7,0—7,5 *при 37 °С*. Из-за влияния температуры на присутствующие компоненты буфера эквивалентное физиологическое значение pH при температуре около 0 °С для тканей животных ближе к 8,0, чем к 7,0. Некоторые проблемы контроля pH при приготовлении экстракта обсуждались ранее (см. разд. 2.3).

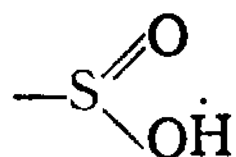
Всегда принималось как нечто само собой разумеющееся, что очистка ферментов должна выполняться на холоде из-за того, что ферменты весьма лабильны; снижение температуры на 20 °C понижает скорость большинства процессов в 3—5 раз, и потому проведение операций с ферментами на холоде более целесообразно. Однако низкая температура замедляет также и процессы, связанные с разделением, например при ионообменной хроматографии; следовательно, если при этом приходится увеличивать время разделения в той же самой степени, то никакого выигрыша не достигается. Это не относится к денатурации, так как она очень сильно зависит от температуры (см. разд. 3.5). Но большинство белков, особенно у теплокровных млекопитающих, проявляет незначительные признаки тепловой денатурации при температуре ниже 40 °C, если значение pH близко к физиологической величине, они сохраняются в этих условиях в течение нескольких дней. Только у видов с постоянно холодными тканями, например у рыб, обитающих в холодной воде, тепловую денатурацию может вызвать и комнатная температура. Некоторые ферменты даже денатурируют (изменяют свои естественные свойства) под воздействием холода — явление, известное как холодовая денатурация, — в результате ослабления гидрофобных взаимодействий, стабилизирующих структуру молекулы. Поэтому, хотя обычно и рекомендуется держать растворы на льду в то время, когда они не подвергаются фракционированию, иногда при проведении фракционирования их лучше подогреть. Часто нет *необходимости* работать в холодной комнате; всегда удобнее этого не делать.

Избирательная денатурация, а также использование органических растворителей в процессе фракционирования обсуждались ранее (см. разд. 3.4 и 3.5). Применение последнего метода обычно требует низких температур для предотвращения денатурации. В противном случае белковые растворы нельзя подвергать действию органических растворителей или других денатурантов, таких, как мочевина или додецилсульфат.

Инактивация каталитического центра

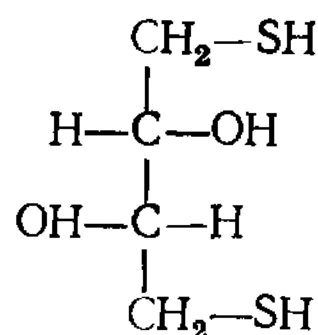
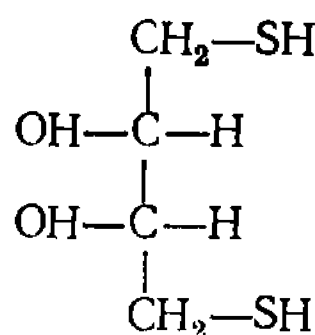
Труднее избежать инактивации ферментов в результате специфических воздействий на каталитический центр. Утрату кофакторов можно предотвратить (если они известны), добавив их вновь к раствору фермента или включив их в используемые буферы. Перед определением ферментативной активности может потребоваться предварительная инкубация фермента с кофактором; апофермент обычно не менее стабилен, чем голофермент, поэтому большая часть утраченной активности может быть восстановлена. Более серьезную проблему представляют

ковалентные модификации активного центра в результате воздействия на фермент неблагоприятного окружения. Активный центр фермента содержит аминокислотные остатки, которые чрезвычайно реакционноспособны и поэтому ответственны за каталитические свойства фермента. Эти остатки также более, чем другие, восприимчивы к модификации. Наибольшие трудности встречаются с цистеином; сульфгидрильные группы в активном центре могут находиться в ионизированной форме, которая очень склонна к окислению. Обычно восстанавливающие условия и наличие других сульфгидрилсодержащих молекул внутри клетки защищают эти группы. При более высоком напряжении кислорода в клетке сульфгидрильные группы могут вступать в следующие реакции: а) образование дисульфидной связи: —S—S—; б) частичное окисление до сульфиновой кислоты: —S—OH; в) необратимое окисление до сульфокислоты:



Для образования дисульфидной связи необходимо, чтобы другая сульфгидрильная группа находилась рядом и чтобы происходил процесс окисления. Образование дисульфида значительно ускоряется в присутствии двухвалентных ионов, которые способны активировать молекулы кислорода и образовывать комплексы с сульфгидрильными группами. Существуют два метода защиты сульфгидрильных групп: 1) удаление всех следов ионов (тяжелого) металла с помощью комплексообразующего агента, например ЭДТА, и 2) введение в раствор сульфгидрилсодержащего реактива, такого, как β-меркаптоэтанол или дитиотреитол либо дитиоэритритол (реактивы Клеланда) [156]:






β-Меркаптоэтанол выпускается в виде тяжелой пахучей жидкости. В качестве защитного агента его следует использовать в концентрации между 5 и 20 мМ; в более низких концентрациях он быстро превращается в дисульфид в результате окисления. Защитная способность его утрачивается в пределах 24 ч, если раствор не содержат в анаэробных условиях, так как любой образовавшийся дисульфид может обмениваться со все еще активными сульфгидрильными группами, оставшимися в белке.

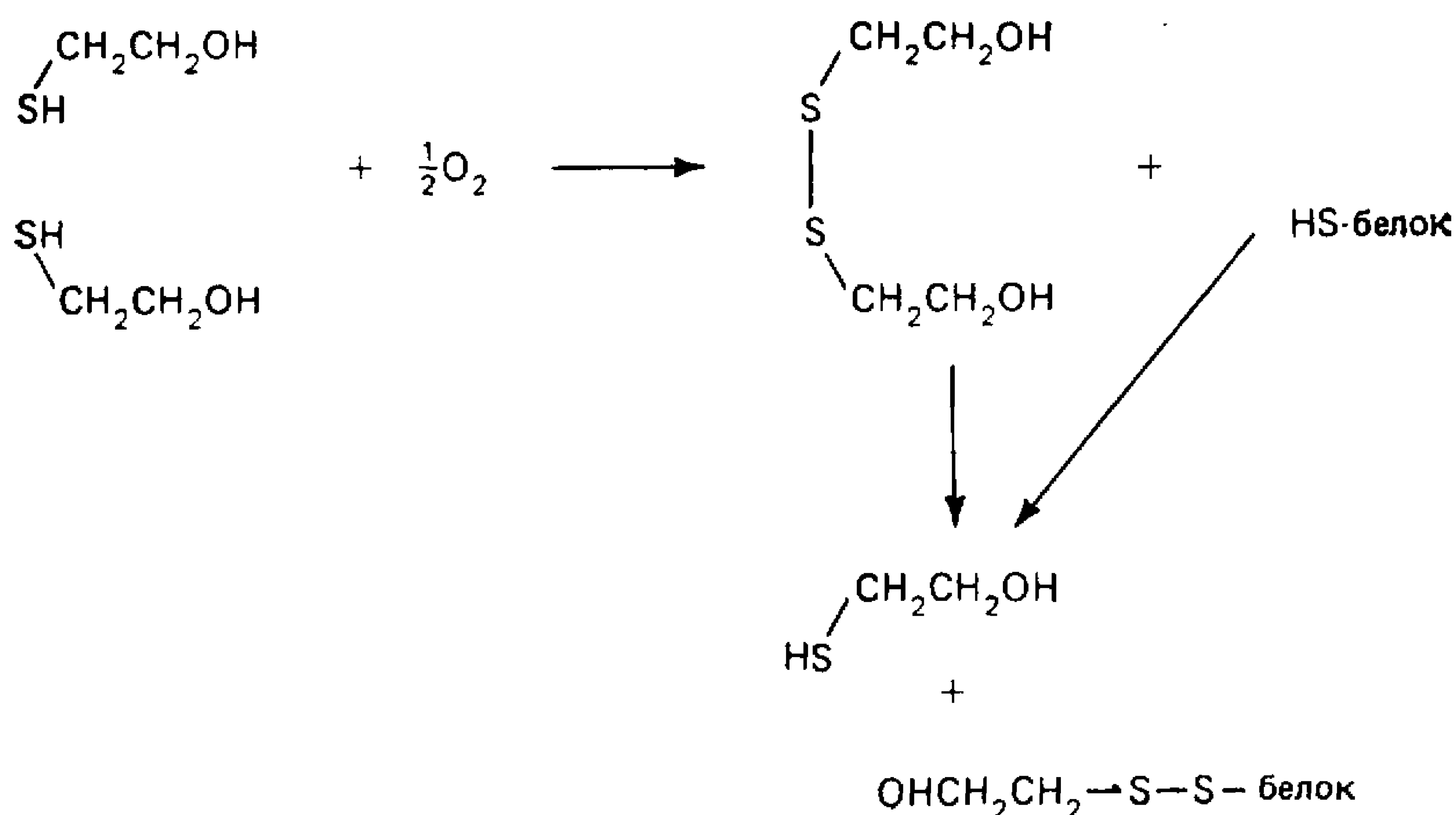


Рис. 6.3. Инактивация каталитически активной сульфгидрильной группы в ферменте окисленным β-меркаптоэтанолом.

Окисленный β-меркаптоэтанол способен даже ускорять процесс инактивации (рис. 6.3).

Хотя образование дисульфидной связи обратимо, оно нежелательно. Дитиоаналоги восстановленных сахаров треитола и эритритола представляют собой белые твердые вещества, которые в очищенном виде имеют очень слабый запах. Для того чтобы обеспечить их защитное действие в течение 24 ч, достаточна концентрация, составляющая лишь 0,5—1 мМ, так как дисульфид, образовавшийся в результате окисления, — это стабильный внутримолекулярный дисульфид, который не обменивается с сульфгидрильными группами белка (рис. 6.4).

Другие используемые сульфгидрильные защитные реактивы со свойствами, близкими к меркаптоэтанолу, это 2,3-димеркаптопропанол, тиогликолат, глутатион и цистеин. Цистеин окисляется довольно быстро, особенно в присутствии ионов тяжелых металлов.

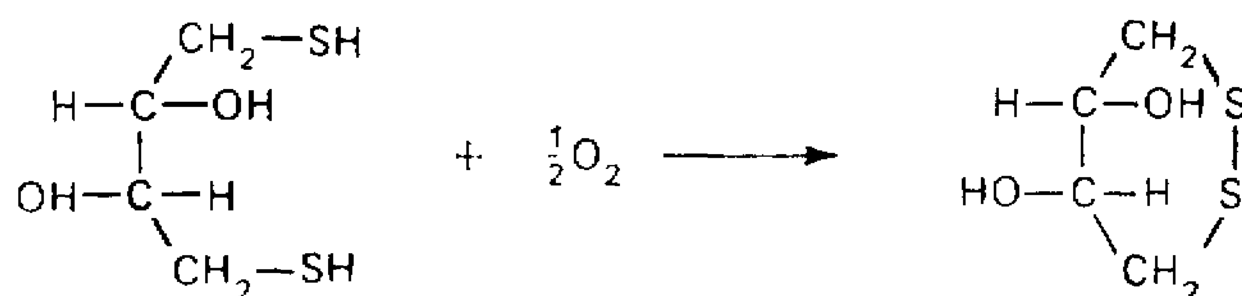


Рис. 6.4. Окисление дитиотреитола с образованием неактивного циклического дисульфида.

Обычно для получения хороших результатов используют меркаптоэтанол (если он необходим), разведенный в момент приготовления в соотношении 1 : 1000 (~12 мМ), а для более длительного хранения применяют дитиотреитол в концентрации 1—5 мМ. ЭДТА, как правило, присутствует во всех буферах в концентрации 0,1—0,2 мМ. Однако встречаются случаи, когда присутствие комплексообразующего агента приносит вред, так как он может удалять из активного центра фермента важные для его функционирования ионы металлов. Тогда могут понадобиться очень чистые соли, не загрязненные тяжелыми металлами, или, возможно, будет достаточно более слабого комплексообразующего агента (например, имидазольного буфера).

Здесь следует сказать несколько слов о разбавленных растворах ферментов. Хорошо известно, что очень разбавленные ферментные растворы быстро теряют активность, но эту потерю можно предотвратить, если добавить в раствор относительно большое количество другого белка, чаще всего бычьего сывороточного альбумина (БСА). При процедурах по очистке обычно не добавляют сопутствующего белка, поэтому очень разбавленные растворы следует концентрировать как можно скорее (см. разд. 1.4). Но для измерения ферментативной активности желательно, чтобы конечная концентрация фермента в ходе анализа была очень низкой — до 1 мкг·мл$^{-1}$. Это может вызвать быструю инактивацию фермента; даже разведение образца непосредственно перед анализом иногда приводит к потерям. В этих случаях добавление БСА как стабилизатора оправданно и должно всегда использоваться. Характер действия БСА не ясен и, вероятно, включает различные эффекты. Крайняя степень разведения белка может привести к диссоциации субъединиц, которые либо не обладают активностью, либо, даже если они полностью сохраняют активность, становятся нестабильными и быстро денатурируют. Возможно, что БСА взаимодействует непосредственно с разбавленным белком, снижая вероятность его диссоциации или стабилизируя субъединицы. Кроме того, небольшое количество белка, присутствующего в растворе, может адсорбироваться на стенках контейнера, особенно если он стеклянный. 1 мкг белка может быть полностью связан на 5 см^2 стенки контейнера, но в присутствии 1 мг БСА 1 мкг адсорбированного белка практически полностью будет представлен БСА, и поэтому лишь небольшое количество фермента будет потеряно из раствора. Для разбавления белковых растворов перед анализом следует использовать подходящий буфер, содержащий БСА в концентрации до 10 мг·мл$^{-1}$, а в самой анализируемой смеси концентрация БСА должна составлять по крайней мере 0,1 мг·мл$^{-1}$.

Протеолитическое расщепление ферментов

Живые клетки содержат «инструменты» своего собственного разрушения, а именно деструктивные гидролитические ферменты, такие, как нуклеазы, полисахаридгидролазы, фосфатазы и протеазы (протеиназы, протеолитические ферменты). В клетках млекопитающих они заключены в лизосомы и освобождаются в контролируемых условиях. Эти ферменты обычно действуют на строго определенные молекулы, разрушая их, если это диктуется физиологическим состоянием организма. У растений деструктивные ферменты хранятся в вакуолях; их действие в цитоплазме находится под контролем различных специфических ингибиторов. У микроорганизмов гидролитические ферменты часто обнаруживаются между плазматической мембраной и клеточной стенкой. Их роль заключается главным образом в расщеплении внеклеточных макромолекул. В процессе получения содержащего ферменты клеточного экстракта наблюдающееся в клетке неустойчивое равновесие между отдельными ее компонентами почти неизбежно нарушается, в результате чего эти ферменты смешиваются с содержимым клетки. Протеолитическим ферментам уделено здесь особое внимание. Существуют методы, позволяющие свести к минимуму разрушение лизосом при экстрагировании мягких тканей животных [157], но во многих случаях, когда разрушение самой клетки требует энергичной гомогенизации, они неприемлемы. Кроме того, при использовании больших количеств исходного материала обработка клеток гормонами или ферментами с целью осторожного освобождения их содержимого непрактична. Следовательно, мы должны принять как факт, что деструктивные ферменты будут присутствовать в экстракте, и с ними надо что-то делать.

Широко распространенные в тканях протеолитические ферменты специфически подавляются ингибиторами, которые представляют собой соединения, образующиеся химическим путем или имеющие биологическое происхождение. К сожалению, есть много протеолитических ферментов различных типов, не все из которых могут эффективно ингибироваться. К основным категориям протеолитических ферментов [158] относятся: 1) сериновые протеазы (например, трипсин, химотрипсин, ферменты эластазы), КФ подкласс 3.4.21; 2) тиоловые (например, папаин, дрожжевая протеиназа В), КФ подкласс 3.4.22; 3) кислые протеазы (например, пепсин, катепсины D), КФ подкласс 3.4.23; 4) металлопротеиназы (например, коллагеназы, многие микробные нейтральные протеиназы), КФ подкласс 3.4.24; 5) карбоксипептидазы (отщепляют С-концевые остатки), КФ подклассы 3.4.16, 17; 6) пептидазы (отщепляют

главным образом N-концевые остатки) КФ подклассы 3.4.11—15.

Основные усилия в решении проблемы протеолитических ферментов были направлены на сериновые протеазы, причем сначала был использован высоко токсичный ДФФ (диизопропилфторфосфат); его токсичность обусловлена тем, что он летуч и подавляет другую сериновую гидролазу — ацетилхолинэстеразу человека, имеющую большое значение для нервной проводимости. Внедрение в практику фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ) [159], о котором известно, что он не ингибирует ацетилхолинэстеразу, сделало работу химиков по подавлению протеолиза менее опасной; ФМСФ широко используется и в настоящее время. Хотя ФМСФ не очень хорошо растворяется в водных растворах, его можно растворять в ацетоне, перед тем как вводить в экстракт, в котором его конечная концентрация должна быть 0,5—1 мМ. Так как ФМСФ довольно быстро гидролизуется, его следует добавлять прямо в раствор, содержащий сериновые эстеразы, а не растворять в буфере еще до приготовления гомогената. ФМСФ ингибирует также некоторые тиоловые протеазы и отдельные карбоксипептидазы и поэтому является очень полезным реактивом; в присутствии ФМСФ ферменты необратимо инактивируются, так что в дальнейшем добавления ингибитора больше не требуется.

Кислые протеазы не содержат каталитически активных сериновых или цистеиновых остатков и не чувствительны к ФМСФ. Однако грибы *Streptomyces* spp. [160] вырабатывают внеклеточный пептид сложной структуры, который представляет собой сильный ингибитор кислых протеаз, таких, как пепсин, катепсин D и дрожжевая протеаза А. Его называют «пепстатин А», и он эффективно действует даже в такой низкой концентрации, как 10^{-7} М. Пепстатин А имеется в продаже. Описан целый ряд сходных протеолитических ингибиторов, в том числе лейпептин — ингибитор некоторых наиболее активных пептидаз. Эти ингибиторы прочно связываются с протеазами, но действие их обратимо, и поэтому в процессе очистки может потребоваться дополнительное добавление их к ферментному раствору. Пепстатин А, связанный с агарозной колонкой (см. разд. 4.5), использовался для очистки катепсина D [161]. Вероятно, можно рассчитывать, что, пропустив экстракт через колонку, содержащую ряд связанных с ней протеолитических ингибиторов, удастся удалить протеазы еще до начала процедуры фракционирования. Ферменты класса металлопротеиназ, активность которых зависит от присутствия двухвалентного металла, ингибируются ЭДТА просто потому, что он образует комплексы с ионами металлов.

Свежеприготовленный экстракт можно обработать 2—5 мМ ЭДТА, 0,5—1 мМ ФМСФ и 10^{-7} М пепстатином А при условии, что ни один из этих реактивов не оказывает неблагоприятного воздействия на выделяемый фермент.

Другие факторы, стабилизирующие ферменты

1—2%-ные водные растворы белков несравнимы по своей концентрации с естественной средой, окружающей молекулы белков. Обычно все компоненты цитоплазмы (не считая воду) составляют в сумме 10—15% (вес/объем), причем большинство этих компонентов (в основном белки) содержит значительное количество связанной или по крайней мере слабо ассоциированной воды. Исследования ЯМР содержащейся в клетках воды показали, что большая часть этой воды не может свободно перемещаться. Вероятно, белки приспособлены к этим условиям в большей степени, нежели к искусственным растворам, используемым в биохимической лаборатории. Следовательно, стабилизация (против денатурации и других более тонких конформационных изменений, которые приводят к инактивации) может быть достигнута путем имитации условий, обеспечивающих относительно низкую активность воды. Наиболее широко используемый метод заключается в том, что в буферные растворы добавляется глицерин. Это вещество полностью смешивается с водой и образует с молекулами воды сильные водородные связи, эффективно замедляя движение молекул и тем самым снижая активность воды. Недавнее исследование эффекта глицерина позволило предположить, что молекулы белка предпочтительно связывают воду и образующаяся при этом структура обладает меньшей способностью разворачиваться в структурированном растворе глицерина, чем в одной воде [162]. Глицерин применяется в концентрации до 50% (вес/объем), хотя самые высокие концентрации обычно используют при хранении, так как вязкость подобных растворов слишком высока для каких-либо манипуляций, кроме электрофореза. Но смеси, содержащие 20—30% (вес/объем) глицерина, имеют небольшую вязкость, и многие процедуры можно осуществлять в буферах, содержащих такое количество глицерина. Присутствие глицерина незначительно влияет на ионообменную хроматографию; это еще раз указывает на то, что ионный обмен полностью зависит от электростатических взаимодействий. В этот процесс не вовлечены водородные связи и гидрофобные взаимодействия, которые были бы ослаблены глицерином. Высаливание также может зависеть от присутствия глицерина — либо изменяется процент насыщения, требуемый для осаждения белка, либо (если концентрация глицерина слишком высока) осадок невоз-

можно отцентрифугировать, так как растворитель слишком вязок и плотен.

Стабилизация ферментов глицерином может быть очень эффективным методом; ферменты, которые в обычных условиях инактивируются чрезвычайно быстро, в присутствии глицерина могут оставаться активными в течение нескольких недель. Кроме того, поскольку содержащие глицерин растворы или совсем не замерзают, или образуют тонкую взвесь льда в концентрированной смеси глицерин—растворенное вещество, хранение их при очень низкой температуре не наносит ущерба ферменту. Вместо глицерина успешно используются [163] растворы сахаров или полиспиртов (глюкоза, сахароза, фруктоза, сорбит); механизм их действия, вероятно, сходен с механизмом действия глицерина. Другие гидрофильные вещества, например формамид и диоксан, имеют тенденцию разрушать ферменты при высоких концентрациях.

Снижение эффективной активности воды, как правило, бывает полезным для ферментов, если оно осуществляется способами, не оказывающими дестабилизирующего действия на белок. Высокие концентрации сернокислого аммония, при которых фермент осаждается, проявляют сильное стабилизирующее влияние, и фактически большинство ферментов, имеющихся в продаже, представляют собой суспензии в 2—3 М сернокислом аммонии. Кроме того, для сохранения активности ферментов, а также для предотвращения бактериального загрязнения используется 50%-ный глицерин или лиофилизация. Во время очистки ферментов обычно необходимо оставлять фракции на ночь или даже на более длительное время, и в данном случае следует уделять особое внимание оптимизации условий хранения. При фракционировании сернокислым аммонием фермент нужно оставлять в системе, содержащей как можно более высокую концентрацию сернокислого аммония, например в виде осадка, а не раствора, полученного после его повторного растворения. Если нельзя избежать хранения ферментного раствора в отсутствие защитных агентов, то следует оценить относительные преимущества кратковременного замораживания этого раствора или хранения его при температуре около 0 °С в присутствии протеолитических ингибиторов. Замораживание может инактивировать ферменты. Чувствительность различных ферментов к замораживанию очень сильно варьирует. Потери всегда будут меньше, если начальная концентрация белка высока. Не рекомендуется замораживать раствор с концентрацией белка ниже чем около 2 мг·мл$^{-1}$. Следует помнить, что во время замораживания сначала замерзает чистая вода, что сопровождается повышением концентрации белка и других растворимых веществ. Затем выпадают в осадок наименее растворимые ве-

щества; если среди них окажутся компоненты буфера, то pH заметно изменится (см. разд. 2.1). При замораживании растворов, содержащих хлориды и фосфаты натрия или калия, pH может измениться от нейтрального до 4 или ниже; натриевые соли усиливают этот эффект [4, 5]. Чем выше концентрация белка относительно буферных солей, тем выше буферная способность самого белка, препятствующая радикальным сдвигам pH во время замораживания. Замораживание при температуре ниже эвтектических точек большинства солей (—25 °С) дает наилучшие результаты, так как даже при сдвиге pH затвердевание белков сведет к минимуму всякую денатурацию. Замораживать же растворы при температурах от —10 до —15 °С это, вероятно, не лучше, чем не замораживать их совсем, по крайней мере в том случае, если образец хранится в течение короткого времени (до 24 ч).

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ И СОБЛЮДЕНИЕ РЕКОМЕНДАЦИЙ

В этой главе речь пойдет о последних усилиях, предпринимаемых при очистке белков, когда уже разработан свой собственный метод или испытана одна из опубликованных методик, но ощущается какая-то неудовлетворенность по поводу всей процедуры в целом. Любая схема очистки фермента или другого белка предназначена для того, чтобы достичь одной или всех из нижеперечисленных целей.

1. Высокий общий выход белка по активности.
2. Высокая степень чистоты конечного продукта.
3. Воспроизводимость
   а) в пределах лаборатории,
   б) при увеличении или уменьшении масштаба операций,
   в) в других лабораториях.
4. Экономное использование реактивов и простота оборудования.
5. Возможность проведения работы в удобное для персонала время.

Хотя результаты, указанные в п. 1 и 2, конечно, желательны, в отдельных случаях они могут быть необязательными. Если это новая методика, позволяющая получить полезный препарат, она может быть пригодна для публикации при условии соблюдения п. 3. Прежде чем публиковать данные, необходимо, чтобы был выполнен п. 3, в, который, к сожалению, труднее всего подтвердить. Очень часто этот пункт не выполняется, и многие опубликованные методики по ряду причин не дают удовлетворительных результатов в других лабораториях. Иногда авторы не достаточно часто применяют свою методику, и разработанная ими система оказывается охарактеризованной менее точно, чем они думают. В некоторых случаях в опубликованной методике отсутствует какая-либо важная информация. Еще одна причина кроется в том, что исходный биологический материал никогда не бывает одинаковым; различия в его экстрагируемости и составе могут привести к полной неудаче.

Пункты 4 и 5 касаются технических аспектов и относятся не к эффективности самой схемы, а к повседневной организации

и финансированию работы. Само собой разумеется, что наиболее успешная работа может быть выполнена в хорошо оборудованной и щедро финансируемой лаборатории. Кроме того, если студенты, занимающиеся исследовательской работой, должны быть подготовлены к тому, что при необходимости им придется работать по 12—16 ч подряд, то не так-то просто, да и нецелесообразно убеждать технический персонал делать то же самое; если процесс может быть заморожен (в буквальном смысле) на полпути и продолжен на следующее утро, то все будут только довольны.

Многие из приведенных ниже замечаний касаются достижения намеченной цели более прямым или коротким путем, а также способов экономии времени или реактивов при точном соблюдении необходимых требований в процессе очистки ферментов. В большинстве случаев эти рекомендации не предназначены для пуристов, так как означают отход от идеальной схемы очистки. Быстрота проведения операций может иметь важное значение в свете решения проблем, обсуждавшихся в разд. 6.2. Поэтому, даже если процедура фракционирования выполняется не совсем идеально, но зато быстро, качество конечного продукта может оказаться выше.

7.1. БЫСТРОТА И РАЗРЕШЕНИЕ: ВРЕМЕННОЙ ФАКТОР

Любой процесс, включающий взаимодействие макромолекул, протекает медленно по сравнению с реакциями, в которых участвуют молекулы небольших размеров, — он может длиться минуты, а не секунды или миллисекунды. Поэтому необходимо, чтобы на каждом этапе фракционирования белка устанавливалось равновесие; для достижения полного или почти полного равновесия может потребоваться 20—30 мин. Предположим, что период полуосаждения (белка) равен 2 мин; зависимость степени завершения этого процесса (в процентах) от времени показана на рис. 7.1. Следует отметить, что через 15—20 мин результат практически не отличается от 100%, но 10 мин недостаточно, чтобы считать процесс «завершенным». Оптимальное время в данном примере составило бы около 15 мин — нет необходимости в более продолжительном ожидании, если только вы не хотите выпить чашку кофе. Обычно никто не удосуживается определить оптимальное время того или иного процесса, тогда как различия в качестве получаемых препаратов могут быть обусловлены слишком быстрым прекращением данной процедуры.

Теперь рассмотрим, чем определяются временны́е факторы. Прежде всего, большинство процессов (будь то агрегация молекул белка, адсорбция их на твердой матрице или движение

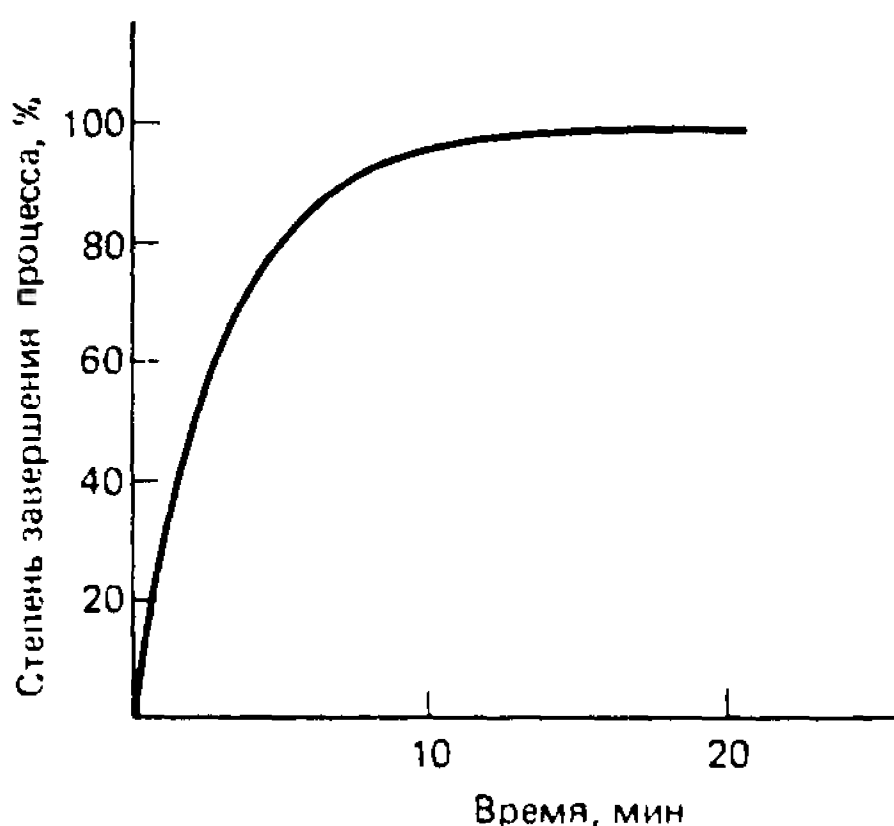


Рис. 7.1. Степень завершения процесса первого порядка с периодом полупревращения, равным 2 мин.

в растворе) контролируется диффузией. При уменьшении коэффициента диффузии вдвое время, требуемое для завершения данного процесса, удваивается, и, так как коэффициент диффузии для каждой данной молекулы зависит как от температуры, так и от вязкости среды, оба этих фактора имеют большое значение. Традиционно ферменты считаются настолько лабильными, что во время их выделения всегда стремятся поддерживать температуру около 0 °С; большинство препаратов все еще получают при низких температурах. В то же время существует много (а возможно, и большинство) ферментов, которые обладают высокой устойчивостью к денатурации (кроме денатурации, происходящей в условиях фракционирования белков органическими растворителями) при комнатной температуре, особенно когда на фракционирование уходит относительно мало времени. Если разница между температурой холодной комнаты и средней температурой лаборатории составляет 20 °С, то это значит, что скорости химических реакций увеличатся в лаборатории в три-четыре раза. При 25 °С любая реакция окисления, протеолиз или какой-либо другой вредный для ферментов процесс, кроме денатурации, происходят намного быстрее, чем при 4—5 °С, однако из тех же соображений можно ожидать, что при любой процедуре фракционирования для достижения равновесия при 25 °С потребуется меньше времени. Это имеет особое значение для колоночных методов, так как максимальная скорость операций на ионообменных или гель-фильтрующих колонках определяется скоростью достижения равновесия происходящих во время хроматографии процессов. Если коэффициент диффузии для белка в растворителе при 5 °С в четыре раза ниже, чем при 25 °С, то и скорость потока через колонку должна быть в четыре раза меньше. Однако вязкость воды при 5 °С

в 1,8 раза выше, чем при 25 °С; уменьшение коэффициента диффузии при более низких температурах обусловлено главным образом повышением вязкости раствора. Поэтому более вероятно, что коэффициент диффузии уменьшится в два раза, а не в четыре. Таким образом, вследствие того, что скорость потока снижается вдвое, а скорость инактивации фермента — в четыре раза, желательно проводить все операции с ферментами на холоде. Многие исследователи, работающие с ферментами, спокойно оставляют раствор на холоде на ночь, но считают совершенно недопустимым оставлять его при комнатной температуре на час или около того. Однако хранение ферментного раствора в течение 4—5 ч при комнатной температуре эквивалентно хранению его на холоде в течение ночи; если нет уверенности в стабильности полученного препарата, то лучше не делать ни того ни другого, если только такое выдерживание ферментного раствора не является частью процедуры фракционирования.

Как было установлено, во многих случаях необходима стабилизация ферментов глицерином или другими полигидроксилированными соединениями. Использовались концентрации глицерина от 20 до 50% (вес/объем). Чистый глицерин почти в 100 раз более вязок, чем вода, хотя, к счастью, для смесей глицерина с водой не наблюдается линейной зависимости вязкости от состава смеси. В табл. 7.1 представлены некоторые величины вязкости для растворов глицерина и сахарозы. Следует отметить, что 25%-ный глицерин имеет в два раза более высокую вязкость, чем вода, а у 50%-ного глицерина вязкость в шесть раз выше, чем у воды. Таким образом, процессы, стабилизирующиеся при наличии в среде глицерина в таких концентрациях, требуют дополнительного времени для своего завершения. Раствор, содержащий 25% глицерина, при 5 °С должен проходить через колонку в четыре раза медленнее, чем тот же раствор при отсутствии глицерина и температуре 25 °С. Оче-

Таблица 7.1. Вязкость растворов сахарозы и глицерина

Концентрация, % (вес/объем)	Вязкость, сПз		
	сахароза		глицерин, 25 °С
	0 °С	25 °С	
0	1,78	0,89	0,89
10	2,46	1,18	1,06
20	3,77	1,70	1,54
30	6,66	2,74	2,12
40	14,58	5,16	3,18
50			5,2

Таблица 7.2. Приблизительное время и скорость потока, необходимые для достижения условий, близких к равновесным, при фракционировании белков

Метод	5 °С	25 °С
Фракционирование сернокислым аммонием	20—30 мин	10—15 мин
Осаждение органическими растворителями	15—20 мин	(Не применяется)
Изоэлектрическое осаждение	20—30 мин	10—15 мин*
Ионообменники:		
КМ- и ДЭАЭ-целлюлозы	10—15 $см \cdot ч^{-1}$	20—30 $см \cdot ч^{-1}$
КМ- и ДЭАЭ-агарозы, сефацел	15—20 $см \cdot ч^{-1}$	30—40 $см \cdot ч^{-1}$
Аффинные адсорбенты**	5—10 $см \cdot ч^{-1}$	10—20 $см \cdot ч^{-1}$
Иммуноадсорбенты	Контактное время составляет несколько часов	
Окрашенные адсорбенты**	10—15 $см \cdot ч^{-1}$	20—30 $см \cdot ч^{-1}$
Гель-фильтрация:		
сефадекс (тонкий) агароза, ультрагель, сефакрилы	2—5 $см \cdot ч^{-1}$ 10—15 $см \cdot ч^{-1}$	4—10 $см \cdot ч^{-1}$ 20—30 $см \cdot ч^{-1}$

* Обычно выполняется на холоде, чтобы избежать денатурации при нефизиологических значениях pH.

** «Кинетическая адсорбция» происходит при скорости потока 500 $см \cdot ч^{-1}$ [12] для очень прочно связывающихся белков.

видно, глицерин в качестве стабилизатора стоит использовать только в том случае, если полученный при этом коэффициент стабилизации превышает указанный временной фактор.

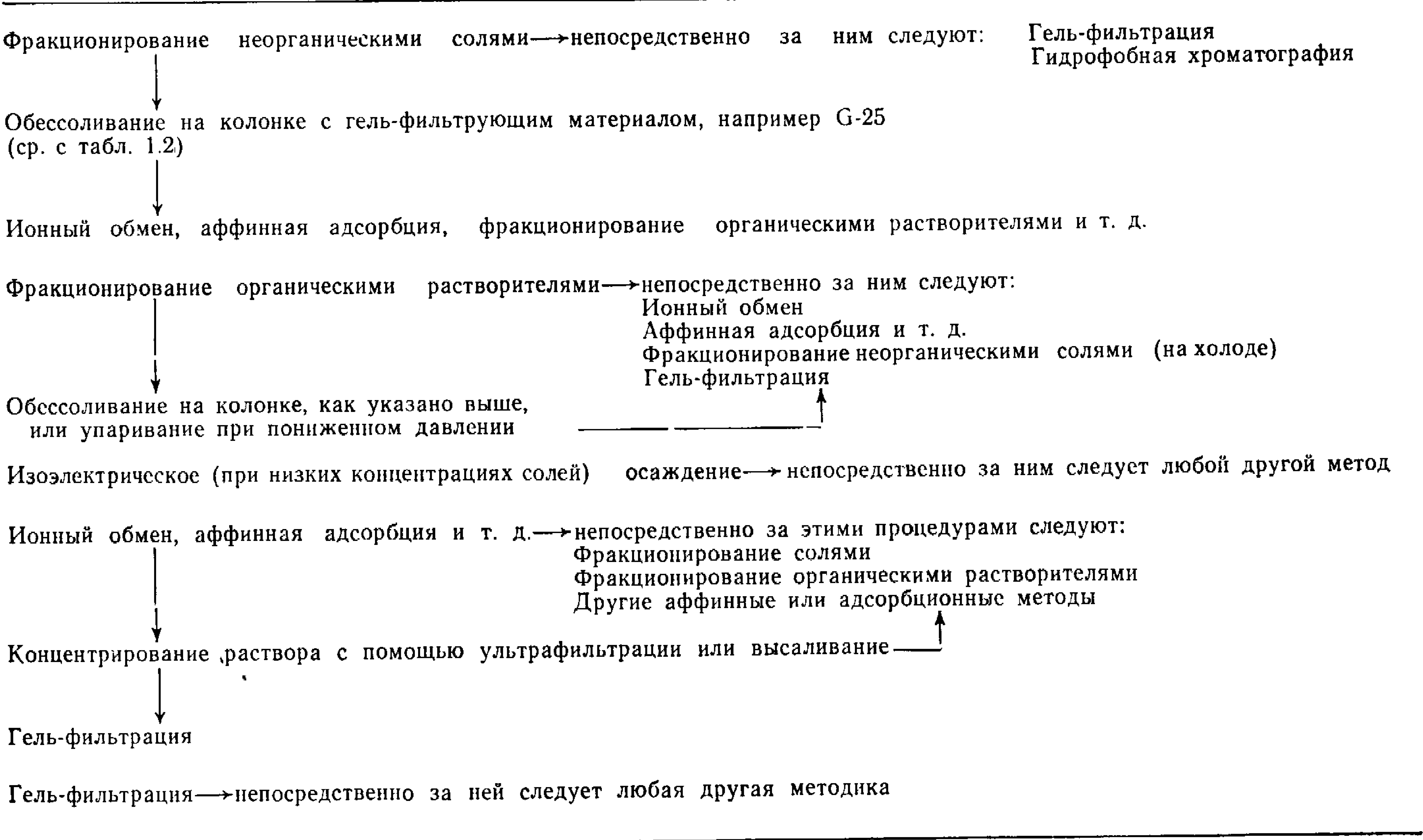
Какое время необходимо для достижения практически полного равновесия?. Нельзя привести точных цифр, так как они варьируют в зависимости от условий (крупные белки диффундируют более медленно, чем мелкие, в результате чего временной фактор может измениться в два раза). Но в общем можно использовать приблизительные данные, приведенные в табл. 7.2.

Общее время, затрачиваемое на каждую стадию фракционирования, теоретически не зависит от объема, но на практике работа с большими объемами неизбежно занимает больше времени. Это обсуждается далее в разд. 7.3. Учитывая, что чем быстрее осуществляется выделение, тем менее вероятно, что конечный продукт будет разрушен, следует принимать какие-то компромиссные решения относительно целесообразности соблюдения идеальных условий. Например, можно рассуждать следующим образом: «Если я проведу разделение на колонке в холодной комнате при оптимальной скорости потока, то фермент выйдет из колонки примерно в 20.00 и его можно будет оставить в пробирках в коллекторе фракций до утра. С другой стороны, если я проведу разделение при комнатной температу-

ре и быстрее, чем при оптимальной скорости потока, разделение будет несколько хуже, но зато оно закончится к 16.00 и у меня будет время сконцентрировать препарат и заморозить его». В данном примере, работа в холодной комнате будет продолжаться 24 ч при 4 °C, прежде чем можно будет перейти к следующему этапу. При комнатной температуре пройдет только 5—6 ч до того, как образец будет помещен на хранение. С одной стороны, может оказаться, что препарат, полученный в холодной комнате, сильнее разрушен в результате протеолиза или инактивирован вследствие длительного пребывания его в разбавленном растворе; с другой стороны, препарат, выделенный при комнатной температуре, может быть более загрязнен нежелательными белками. Цель всех этих рассуждений заключается не в том, чтобы рекомендовать какую-то одну из этих двух процедур, а в том, чтобы просто указать читателю на два возможных варианта.

Некоторые ферменты необыкновенно устойчивы к инактивации, вызываемой любым из факторов, описанных в разд. 6.2. Часто это отмечается даже тогда, когда процедура очистки продолжается в течение нескольких недель. Внеклеточные ферменты отличаются большой устойчивостью потому, что они существуют в более жестких природных условиях. В таких случаях быстрота операций не имеет большого значения, если решены проблемы протеолитической инактивации. Но в других случаях, когда стабильность фермента не столь велика, скорость операций может быть гораздо важнее, чем разрешение, достигаемое на каждом этапе, даже если это означает включение дополнительной стадии очистки для окончательного удаления из препарата примесей. При очистке нестабильных ферментов следует исключать диализ и гель-фильтрацию на медленно фильтрующих средах. Если это возможно, то одна стадия фракционирования должна следовать за другой без длительной подготовки. Так, после солевого фракционирования может идти гель-фильтрация, поскольку на этой стадии удаляется соль и в то же время происходит фракционирование белков. Но после солевого фракционирования нельзя сразу же использовать метод ионного обмена. Его можно применять только в исключительных случаях, когда соль, содержащаяся в осадке, не препятствует адсорбции нужного белка. Непосредственно после стадии ионного обмена невозможно использовать гель-фильтрацию, так как фракции нужно сконцентрировать, — очень редко при элюции с ионообменника получается острый пик, содержащий концентрированный раствор данного вещества (см., однако, обсуждение аффинной элюции в разд. 4.4 и хроматофокусирования в разд. 4.3). После фракционирования смеси с помощью органического растворителя может следовать ионный

Таблица 7.3. Возможные последовательности процессов фракционирования с указанием промежуточных стадий



обмен, но если фермент адсорбируется слабо, то эндогенные соли, осажденные органическим растворителем вместе с белками, могут слишком сильно повысить ионную силу и помешать адсорбции. В табл. 7.3 дан краткий перечень основных последовательных стадий фракционирования и указаны промежуточные операции, которые выполняются между основными стадиями и позволяют перейти от одного этапа к другому. Необходимо отметить, что во многих случаях, особенно перед стадией хроматографии, требуется центрифугирование для осветления раствора.

Некоторые возможные последовательности этапов фракционирования без промежуточных операций показаны ниже.

Соль ⟶ Гель-фильтрация ⟶ Ионный обмен

Органический растворитель ⟶ Аффинная адсорбция, модифицированный красителем адсорбент и т. д.

Органический растворитель ⟶ {Ионный обмен / Аффинная адсорбция} ⟶ Соль ⟶ Гель-фильтрация

Аффинная адсорбция ⟶ Соль ⟶ Гель-фильтрация

Следует помнить о емкости каждого метода; методы осаждения особенно подходят для первого этапа, так как они позволяют работать с очень большим количеством материала. Гель-фильтрация характеризуется умеренной емкостью, если нет возможности использовать колонки огромных размеров. Аффинной адсорбции свойственна низкая емкость, однако этот метод позволяет обработать большое количество белка, если фактически адсорбируется лишь незначительная его доля. «Обессоливание», которое можно провести очень быстро, применяется в следующих удобных для практического использования схемах:

Солевое фракционирование ⟶ «Обессоливание» ⟶

Ионный обмен или аффинная адсорбция ⟶

Концентрация с помощью «высаливания» ⟶ Гель-фильтрация

или

Органический растворитель ⟶ Солевое фракционирование ⟶

«Обессоливание» ⟶ Ионный обмен или аффинная адсорбция

При условии что этих трех или четырех этапов достаточно, часто всю процедуру можно завершить за 5—6 ч и если неочищенный экстракт получен в начале рабочего дня, то очистка достигается за 1 день. Но допустимы и паузы, при условии что

деградационные изменения предотвращены, насколько это возможно. Рекомендуются два основных метода хранения белка в течение ночи или даже несколько более длительного времени.

1. Хранение осадка, полученного путем осаждения белкового раствора сернокислым аммонием, на холоде (без замораживания), причем лучше не разводить его буфером. Высокая концентрация соли стабилизирует фермент и обычно ингибирует протеазы. Однако таким способом нельзя хранить неочищенные фракции неограниченно долгое время: самый длительный срок хранения при этом составляет не более 2—3 дней при 4 °С.

2. Хранение белков в замороженном виде. Если температура достаточно низка, все деградационные процессы прекращаются, и образец можно хранить в течение неопределенно долгого времени. Рекомендуется поддерживать температуру ниже —50 °С. Обычные температуры глубокого замораживания (но не выше —15 °С), как правило, подходят для хранения белковых растворов в течение одной ночи. Однако не следует замораживать разбавленный раствор белков; весьма вероятно, что в разбавленных растворах (<2 $мг \cdot мл^{-1}$) белки будут денатурировать при замораживании и последующем их оттаивании (кроме того, такие растворы занимают больше места в морозильнике). Перед замораживанием необходимо измерить pH и убедиться, что раствор хорошо забуферен. Замораживать растворы следует в пластиковых контейнерах (стеклянные контейнеры трескаются, когда при образовании льда объем раствора увеличивается). Оттаивание замороженных растворов нужно производить быстро, погружая контейнеры в теплую воду. При проведении крупномасштабных работ для этой цели можно применять, соблюдая осторожность, микроволновую печь. Необходимо помнить, что пластики являются плохими проводниками тепла, и даже если снаружи температура воды составляет 50 °С, внутренняя поверхность контейнера будет иметь температуру не выше 30 °С; если же раствор во время оттаивания перемешивать, мало вероятно, что произойдет тепловая денатурация.

В заключение следует отметить, что временной фактор может быть очень важен при работе с лабильными ферментами или экстрактами, обладающими высокой протеолитической активностью. В конечном счете, может быть, лучше проводить как можно скорее одну стадию за другой, жертвуя при этом в какой-то мере качеством разделения, чем доводить каждый процесс до совершенства, но тратить больше времени на выделение. С другой стороны, при очистке стабильных ферментов, может быть, лучше уделять больше внимания максимальной степени разрешения, особенно если это устраняет необходимость в последующих этапах очистки для удаления примесей.

7.2. УВЕЛИЧЕНИЕ И УМЕНЬШЕНИЕ МАСШТАБОВ ОПЕРАЦИЙ

Пробные опыты выполняют обычно с небольшим количеством материала, с тем чтобы увеличить их масштабы, когда методика будет разработана. Исследователи, занимающиеся очисткой ферментов, часто испытывают чувство разочарования из-за того, что при увеличении масштабов работы что-то не ладится и результаты не получаются такими, как ожидалось. Это особенно досадно, когда на получение сырья затрачено много усилий, а в итоге приходится отказываться от всей методики фракционирования. Полезно обсудить, какие параметры могут изменяться при проведении очистки белков в больших масштабах и что следует делать в таких случаях по крайней мере теоретически, чтобы свести к минимуму эти изменения.

Первым источником изменчивости является экстракт. Очевидно, что для обработки большего количества сырья требуется другой, более крупный гомогенизатор. Продолжительность процедуры, необходимой для разрушения всего материала, так же, как и состав экстракта, может изменяться. Даже если количество экстрагированного фермента будет сопоставимо с его количеством в пробных опытах, вполне вероятно, что содержание других белков и небелкового материала в экстракте будет совсем иным, а это может повлиять на условия фракционирования. Кроме того, различные количества загрязняющих белков, проходящих через второй, третий и последующие этапы фракционирования, могут полностью изменить первоначальные результаты. Если проблема заключается именно в этом, то рекомендуется провести пробные опыты с экстрактом, полученным в большом количестве.

Проведение стадий осаждения в более крупном масштабе не должно вызывать каких-либо затруднений. Но следует отметить, что осадок после центрифугирования содержит какую-то долю надосадочной жидкости и эта доля зависит от плотности осадка. В пробных опытах часто используют центрифугирование на довольно высоких скоростях (так как при этом можно получить большие величины g с помощью маленьких роторов), тогда как при проведении опытов в более крупных масштабах это часто становится невозможным. В результате осадок оказывается менее плотным, и поэтому бóльшая часть примесей переходит на следующую стадию. Еще важнее количество осадителя, попадающего на следующую стадию; например, избыточное количество сернокислого аммония может полностью нарушить весь процесс гель-фильтрации; белки могут даже вновь выпасть в осадок в самой колонке. Если трудности связаны с недостаточной плотностью осадка, то решить эту проблему можно, переместив суспензию после декантирования большей

части надосадочной жидкости в небольшую центрифугу, чтобы провести скоростное центрифугирование.

Прежде чем приступить к проведению колоночной хроматографии в более крупном масштабе, необходимо все хорошо обдумать. Важное значение здесь имеют количество белка, приходящегося на единицу объема адсорбента, и скорость потока. Теоретически при увеличении количества нанесенного белка в 10 раз площадь поперечного сечения колонки (без изменения ее высоты) следует увеличить тоже в 10 раз и в 10 раз повысить скорость потока. Однако, как уже говорилось выше, для коротких и толстых колонок характерна неравномерность потока, так что лучше пойти на компромисс, увеличив *оба* размера колонки — и поперечное сечение, и высоту. Объем колонки следует повышать пропорционально количеству наносимого на нее белка; наилучшим компромиссным решением будет сохранение прежних пропорций между шириной и высотой колонки. Таким образом, если в пробном опыте использовалась колонка высотой 5 см и диаметром 1 см, то для увеличения объема хроматографического слоя в 10 раз нужно взять колонку высотой 12 см и диаметром 2 см (исходя из того, что в продаже нет колонок любого возможного диаметра). Скорость потока, выраженная в $см \cdot ч^{-1}$, должна быть такой же, как и в опыте с колонкой небольшого размера. Так как площадь поперечного сечения в четыре раза больше, скорость потока, выраженная в $мл \cdot ч^{-1}$, должна быть только в четыре раза выше. Следовательно, время пропускания раствора через колонку будет в 2,5 раза больше. При идеальном потоке буфера поведение белка и разрешение должны зависеть только от соотношения между объемом колонки и количеством нанесенного на нее образца. При фиксированной скорости потока ($см \cdot ч^{-1}$) форма колонки не имеет значения.

Основные различия между пробным опытом и более крупномасштабной процедурой выявляются тогда, когда необходимо изменить температуру. Легко нагреть 100 мл до 50 °С за две минуты, сохранить эту температуру в течение 5 мин, а затем быстро охладить раствор. Но значительно труднее нагреть 2000 мл раствора, так как из-за недостаточно быстрого теплопереноса неизбежны и более медленное достижение нужной температуры, и более медленное охлаждение раствора. Таким образом, если имеется стадия тепловой денатурации, то следует убедиться, что в критический период непосредственно до и после достижения максимальной температуры денатурация идет не в большей степени, чем это необходимо. Быстрый нагрев можно осуществить с помощью микроволновой печи. Однако и в этом случае остается проблема быстрого охлаждения. Поэтому нужно провести опыт в небольшом масштабе с медлен-

ным нагревом и охлаждением. Если раствор необходимо охладить до 0 °С перед добавлением к нему органического растворителя, то следует помнить, что охлаждение нескольких литров раствора займет очень много времени. Используйте стеклянные контейнеры, так как пластики очень плохо проводят тепло. С другой стороны, если достигнута низкая температура, она легче сохраняется при больших объемах раствора.

Целесообразность проведения процедуры в более крупном масштабе фактически является вопросом здравого смысла; такая операция всегда связана с большими затратами времени и потому требует тщательного планирования. Уменьшение масштабов очистки позволяет провести ту или иную процедуру быстрее, и это нужно учитывать. Если центрифугирование продолжается только 5 мин, а пропускание через колонку — в пределах одного часа, ясно, что работа в небольшом масштабе может быть завершена за очень короткое время. Поэтому, если нужно получить лишь небольшое количество конечного продукта, следует рассмотреть возможность уменьшения масштабов операций. Ниже описывается очистка фруктозо-1,6-бисфосфат-альдолазы из экстракта мышц кролика (экстракт можно хранить продолжительное время при —30 °С).

Расчет затраченного на все операции времени начинают вести с того момента (нулевое время), когда берут 50 мл оттаявшего экстракта; pH доводят до 6,0; все операции выполняют при 25 °С.

Растворяют в экстракте 12 г сернокислого аммония (затраченное на это время составляет 2 мин); перемешивают смесь 5 мин; центрифугируют при 20 000 *g* в течение 3 мин.

Растворяют в надосадочной жидкости 6 г сернокислого аммония, перемешивают суспензию и центрифугируют, как указано выше; растворяют осадок в 5 мл буфера.

Обессоливают раствор в буфере К-МОПС, pH 7,0, на колонке с сефадексом G-25 объемом 50 см^3 (10 мин).

Пропускают полученный раствор через колонку с КМ-целлюлозой (4 см^2×4 см), промывают колонку К-ТЭС буфером, pH 7,5 (10 мин).

Добавляют в этот буфер 0,2 мМ фруктозо-1,6-бисфосфат, в результате чего альдолаза элюируется; добавляют 0,5 г сернокислого аммония на 1 мл фермента (3 мин); перемешивают суспензию 5 мин и центрифугируют; ресуспендируют осадок для кристаллизации.

Затраченное время (мин):

0 Растворение сернокислого аммония, перемешивание, центрифугирование.
20 Растворение сернокислого аммония, перемешивание, центрифугирование.
40 Растворение осадка, обессоливание.
60 Пропускание раствора через КМ-целлюлозу, промывка колонки буфером с pH 7,5.
80 Элюирование фермента буфером, содержащим фруктозо-1,6-P_2; высаливание сернокислым аммонием.
100 Центрифугирование; ресуспендирование осадка для получения кристаллов.

Четыре процесса — фракционирование сернокислым аммонием, обессоливание, ионный обмен с аффинной элюцией и концентрирование раствора с помощью высаливания — занимают 2 ч работы. Это исключительно простой пример, но и многие другие процедуры очистки могут быть очень быстро выполнены при проведении их в небольшом масштабе. Едва ли стоит проводить все эти процедуры на холоде, особенно если это несколько замедлит весь ход работы (см. разд. 7.1).

Иногда бывает необходимо уменьшить масштабы опубликованной методики, если авторы работали с очень большим количеством исходного материала. Например, «110 кг мышечной ткани лошади было...» (!) [164]. В таких случаях следует принимать во внимание соображения, обратные тем, о которых шла речь, когда обсуждались вопросы, связанные с увеличением масштаба операций. Обычно при попытке воспроизвести опубликованную методику сначала проводят опыты с небольшим количеством материала, поэтому возникает двойная проблема — уменьшения масштаба операций и воспроизведения опубликованных результатов. Этот вопрос обсуждается в следующем разделе.

7.3. ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ОПУБЛИКОВАННОЙ МЕТОДИКИ

Этот раздел касается большинства исследователей; существует так много опубликованных методик (иногда десятки для одного и того же фермента), что неразумно начинать работу, не ознакомившись с предшествующей литературой. Многие пытаются в точности следовать всем указаниям, данным в опубликованной методике. Часто это приводит к успеху, и в этом случае нет необходимости вносить какие-либо изменения, кроме самых мелких. Но столь же часто опубликованная методика оказывается совершенно невоспроизводимой и не приводит к

получению сколько-нибудь пригодного препарата фермента. Иногда это вина авторов, а иногда — результат небрежности тех, кто пытается повторить уже разработанную процедуру. Цель данного раздела состоит в том, чтобы описать подходы, которые следует использовать как в начале работы, так и позднее, если что-то не получается.

Прежде всего необходимо отличать несущественную информацию от важных фактов. Следующие примеры взяты из опубликованных методик:

> «Осадок экстрагировали 469 мл буфера А... и подвергали диализу в течение ночи против буфера А для удаления этанола».

Такое точное указание объема в данном случае не имеет никакого смысла; 450 или 500 мл дадут одинаково хорошие результаты — в любом случае объем изменится при диализе.

> «...элюцию проводили с помощью линейного градиента NaCl; собирали фракции объемом *около* 3 мл... фракции, содержащие активность (от 41 до 53), смешивали».

Номера пробирок ничего не говорят читателю, так как авторы точно не указали, какой объем прошел через колонку до того, как появилась активность.

> «...подвергали диализу против буфера В в течение 24 ч».

Была ли смена диализата? Какой объем буфера В использовался? Это может быть очень важным для проведения диализа и следующей стадии.

> «Смесь нагревали при постоянном слабом перемешивании в течение 10 мин при 62 °С».

Сколько времени ушло на нагрев смеси до 62 °С и как быстро она охладилась?

> «Остатки разрушенной ткани осаждали в центрифуге «МСЕ Мистрал 62» при 2000 об/мин в течение 20 мин при 5 °С».

Конечно, нет никакой необходимости идти и покупать центрифугу «МСЕ Мистрал 62» для выполнения этого этапа; авторам следовало бы указать относительную величину *g*, которая соответствует 2000 об/мин в данном аппарате.

> «...КМ-целлюлоза, уравновешенная 5 мМ буфером трис-HCl, pH 6,5».

Это чрезвычайно странно, так как трис не обладает существенным буферным действием при pH 6,5, особенно если он имеет

5 мМ концентрацию. Эта стадия должна быть тщательно проанализирована и, возможно, модифицирована.

«...50 мМ Na-ацетатный буфер, pH 5,0».

Как был приготовлен этот буфер? Доводился ли 50 мМ Na-ацетат до pH 5,0 уксусной кислотой или HCl? Описания состава буферов не всегда ясны. Насколько это важно? Для ионообменной хроматографии в равной степени важны как ионная сила, так и pH, поэтому состав буфера должен быть четко указан. С другой стороны, если величина pH указана правильно, то буферная сила и состав буфера иногда не имеют большого значения. Даже природа компонентов буфера не должна иметь значения. Буфер другого состава может оказаться вполне пригодным, при условии что он имеет то же самое значение pK_a, что и указанный в методике буфер. Это существенно в том случае, если предлагаемый буфер имеет какой-то необычный состав или труднодоступен. Так, например, какодилат был в значительной степени вытеснен N-морфолиноэтансульфонатом (МЭС). N-Этилморфолин (pK_a 7,7) лишь в редких случаях более предпочтителен, чем трис (pK_a 8,1) или триэтаноламин (pK_a 7,8). Диэтилбарбитурат, называвшийся в более ранних работах вероналом (pK_a 8,0, $n=-1$), также сейчас используется нечасто. Его лучше заменить трицином, если необходим анионный компонент буфера. Следует помнить, что некоторые буферы образуют комплексы с ионами металлов, и это может повлиять на стабильность фермента (см. разд. 6.1). Уже упоминалось о том, что нужно указывать не только значение pH буферного раствора, но и температуру, при которой измеряли pH, и, хотя авторы часто пишут: «все операции выполнялись при 4 °C», — наверняка в большинстве случаев значения pH буферов устанавливались при комнатной температуре.

«На каждые 100 мл экстракта добавляли 49 мл (0,25 насыщения) насыщенного сернокислого аммония».

Цифра в скобках явно ошибочна; 49 мл насыщенного $(NH_4)_2SO_4$, добавленные к 100 мл, составляют 49/149=0,33 насыщения. Та же самая ошибка повторялась несколько раз в этой работе, и очевидно, что авторы плохо представляли себе, что означает доля насыщения, или у них было свое собственное, не известное всем остальным определение. Хорошо, что была дана двойная информация, и, скорее всего, цифры, не заключенные в скобки, отражают то, что было сделано в действительности, т. е. то, что может быть воспроизведено. Если бы они только указали, что «насыщенный сернокислый аммоний был добавлен до 0,25 насыщения», тогда их ошибка привела бы к невоспроизводимости работы. В литературе встречается мно-

жество странных определений (например, «25%-ное насыщение» сернокислого аммония в значении 25 г/100 мл), и нужно быть твердо уверенным в том, что на самом деле имеется в виду.

После успешного воспроизведения опубликованной процедуры очистки следует подумать, нет ли в ней каких-либо сомнительных стадий и нельзя ли сделать какие-то усовершенствования. Решение попробовать что-то другое может быть целесообразным, если эта процедура была разработана еще до того, как появился какой-либо новый реактив или метод, которые могут упростить весь процесс. Но не следует вносить в методику несущественных изменений, если только вы не чувствуете большого разочарования в связи, например, с низким выходом активности, так как почти наверняка авторы уже затратили какое-то время на внесение в методику различных изменений и опубликовали то, что считали оптимальной процедурой. Если вы не уверены в отношении каких-либо деталей, кратчайший путь решить этот вопрос — связаться непосредственно с автором.

ГЛАВА 8

ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

8.1. ОСНОВНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ФЕРМЕНТАТИВНОГО КАТАЛИЗА

Большинство исследователей, сталкивающихся с проблемой очистки ферментов, используют стандартные методы определения их активности. Однако в ряде случаев полезно разработать какой-либо альтернативный способ, например быстрый спектрофотометрический метод, чтобы избежать очереди к сцинтилляционному счетчику. Изредка возникает необходимость в новом методе тестирования для того или иного вновь обнаруженного фермента. В конечном счете биохимик хочет знать, какова зависимость между активностью фермента in vitro и физиологическими условиями, в которых он функционирует. Однако pH, ионная сила и особенно концентрация субстрата in vivo, скорее всего, весьма отличаются от условий, используемых при измерении ферментативной активности в ходе очистки фермента. В последнем случае все, что нужно исследователю, — это надежный и воспроизводимый метод, с помощью которого можно получить сведения о количестве фермента в каждой фракции независимо от того, что означает понятие «активность» в физиологическом смысле.

Ферментативная активность зависит от концентраций субстрата (или субстратов), активаторов и ингибиторов, специфичных для данного фермента, и от неспецифических влияний таких соединений, как соли и компоненты буфера, а также от pH, ионной силы и температуры, а иногда и от взаимодействий с другими белками или компонентами мембран, которые могут присутствовать в реакционной смеси. Обычно стремятся создать оптимальные условия для протекания ферментативной реакции, с тем чтобы фермент проявлял максимальную активность (V_{max}). Однако это не всегда возможно либо из-за слишком высокой стоимости субстрата или его плохой растворимости, либо потому, что оптимальные условия для данного фермента несовместимы с условиями, необходимыми для другого (сопрягающего) фермента, без которого нельзя определить активность исследуемого фермента. Эти условия будут рассмотрены ниже.

Концентрация субстрата, активаторы и ингибиторы

Активность фермента почти всегда максимальна при самой высокой (из всех возможных) концентраций субстрата. Если фермент подчиняется кинетике Михаэлиса — Ментен, то следует использовать концентрацию субстрата, по крайней мере в 10 раз превышающую величину K_M. При $[S]_0=10K_M$ скорость реакции составляет 91% ее теоретического значения при бесконечно большой концентрации субстрата. Следует помнить, что концентрация одного субстрата обычно влияет на K_M другого, причем характер этого влияния зависит от механизма реакции. Например, для многих реакций, в основе которых лежат последовательные механизмы, справедлива такая зависимость: чем выше концентрация субстрата B, тем ниже K_M для A, и наоборот. Таким образом, высокая концентрация одного субстрата (скажем, самого дешевого) означает, что концентрация другого субстрата должна быть меньше, чтобы достичь значения 10 K_M. С другой стороны, реакции с непоследовательными механизмами (например, «пинг-понг») имеют то удивительное свойство, что чем выше концентрация одного субстрата, тем выше K_M (т. е. ниже кажущееся сродство) для другого; поэтому для достижения V_{max} могут потребоваться очень большие концентрации обоих субстратов.

Есть две причины работать в области концентраций, существенно превышающих величину K_M. Во-первых, небольшие изменения концентрации при переходе от одной серии измерений к другой почти не сказываются на результатах определения. Так,

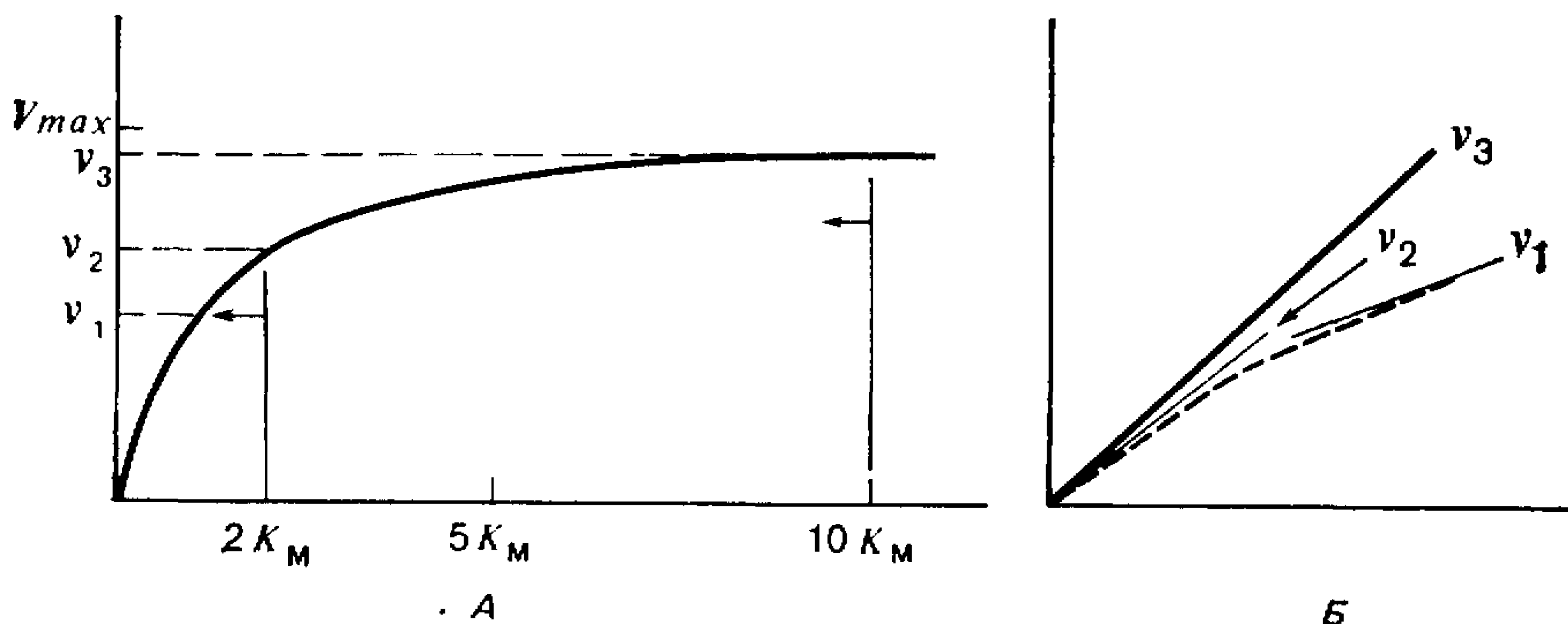


Рис. 8.1. Влияние расходования субстрата на активность фермента. *А*. Соотношение между скоростью реакции и концентрацией субстрата. *Б*. Наблюдаемые скорости реакции в зависимости от расходования субстрата. Начальные концентрации субстрата равны 10 K_M (непрерывная линия) и 2 K_M (прерывистая линия).

Таблица 8.1. Скорость ферментативной реакции при различных концентрациях субстрата[1]

Концентрация	Концентрация субстрата	Концентрация продукта	Скорость (% от V_{max})
Начальная	10 K_M	0	91
Конечная (после удаления продукта)	9 K_M	0	90
Конечная (без удаления продукта)	9 K_M	1 K_{ip}	82
Начальная	2 K_M	0	67
Конечная (после удаления продукта)	1 K_M	0	50
Конечная (без удаления продукта)	1 K_M	1 K_{ip}	33

[1] K_M — константа Михаэлиса для субстрата, K_{ip} — ингибирующая концентрация продукта. Предполагается, что K_{ip} равно K_M.

ошибка в концентрации на 10% приводит только к 1%-ному изменению скорости, что с трудом поддается определению. Таким образом, нет никакой необходимости знать точную концентрацию субстрата, тем более что иногда ее трудно определить. Во-вторых, расходование субстрата в ходе определения будет очень мало влиять на скорость реакции (рис. 8.1), и если накапливающиеся продукты обладают ингибирующим действием, то оно будет меньше проявляться при высокой концентрации субстрата (табл. 8.1). В табл. 8.1 приведен пример, когда продукт связывается с ферментом столь же прочно, как и субстрат. Если такой продукт не удалять в ходе определения, скорость реакции будет неуклонно снижаться и истинная *начальная* скорость окажется заниженной. К ферментам такого типа относятся ферменты, катализирующие легко обратимые реакции, например изомеразы. Иногда технически удобно измерять активность фермента в реакции с положительным значением ΔG^0, когда равновесие сдвинуто в сторону субстратов. В таких случаях желательно удалять *все* продукты в ходе определения. Удаление продуктов происходит естественным путем при использовании сопряженных методов определения активности (см. разд. 8.3). Однако может оказаться, что удалять продукты реакции полезно даже в случае применения периодических методов определения ферментативной активности (см. разд. 8.2).

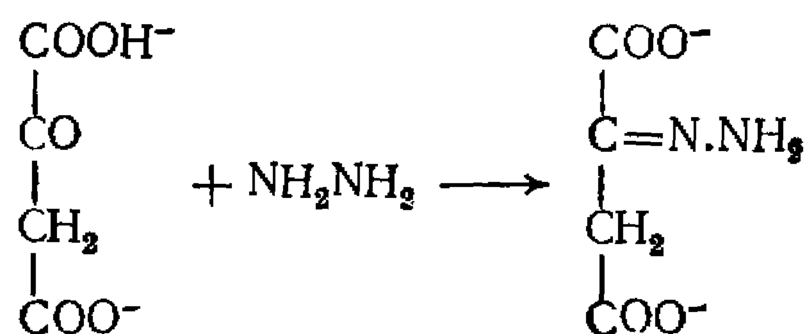
Любое определение требует известного времени для его завершения. Если пренебречь временем достижения начального стационарного состояния, занимающего всего лишь несколько миллисекунд, то скорость реакции должна быть постоянной от нулевого времени и до того момента, когда можно обнаружить

визуально или точно измерить образование продукта реакции. Чтобы решить проблемы, связанные с ингибированием реакции образовавшимся продуктом, и достичь равновесия, применяют разные подходы: используют очень высокие концентрации субстрата, нефизиологические значения pH (если в реакции участвует протон) или весьма чувствительные методы определения продукта, позволяющие ограничиться малой степенью превращения субстрата. В качестве примера приведем реакцию, катализируемую малатдегидрогеназой, которая в физиологических условиях идет в прямом и обратном направлениях:



$$\text{Малат}^{2-} + NAD^+ \rightleftharpoons \text{Оксалоацетат}^{2-} + NADH + H^+$$

При pH 7 равновесие сильно сдвинуто влево; тем не менее высокое отношение $NAD^+/NADH$ в клетке, а также быстрое удаление оксалоацетата могут привести к тому, что суммарный процесс будет идти слева направо. Внутри клетки реакция, конечно, одновременно идет и в противоположном направлении, но в целом превалирует катализ в направлении образования оксалоацетата. Значительная доля присутствующего фермента используется для катализа обратной реакции, так что прямая реакция протекает в условиях, далеко не обеспечивающих достижения V_{max}, т. е. слабо зависит от количества присутствующего фермента. Так как целью является определение количества фермента, необходимо выбрать такие условия, когда обратная реакция не идет. Активность малатдегидрогеназы определяют непосредственно по образованию NADH (или в обратной реакции по исчезновению NADH), поскольку NADH поглощает при 340 нм, тогда как у NAD^+ поглощение в этой области отсутствует (рис. 8.2). Фермент можно определять в термодинамически благоприятном направлении, используя оксалоацетат и NADH при pH 7 или немного ниже. При этом получают определенное значение активности. Кроме того, активность фермента можно определять, вынуждая реакцию идти в прямом направлении. Это достигается 1) в присутствии высоких концентраций малата, обычно 50—100 мМ; 2) при высоких значениях pH (9—10), так как в этих условиях образующиеся протоны связываются, и 3) путем удаления оксалоацетата в виде гидразона:



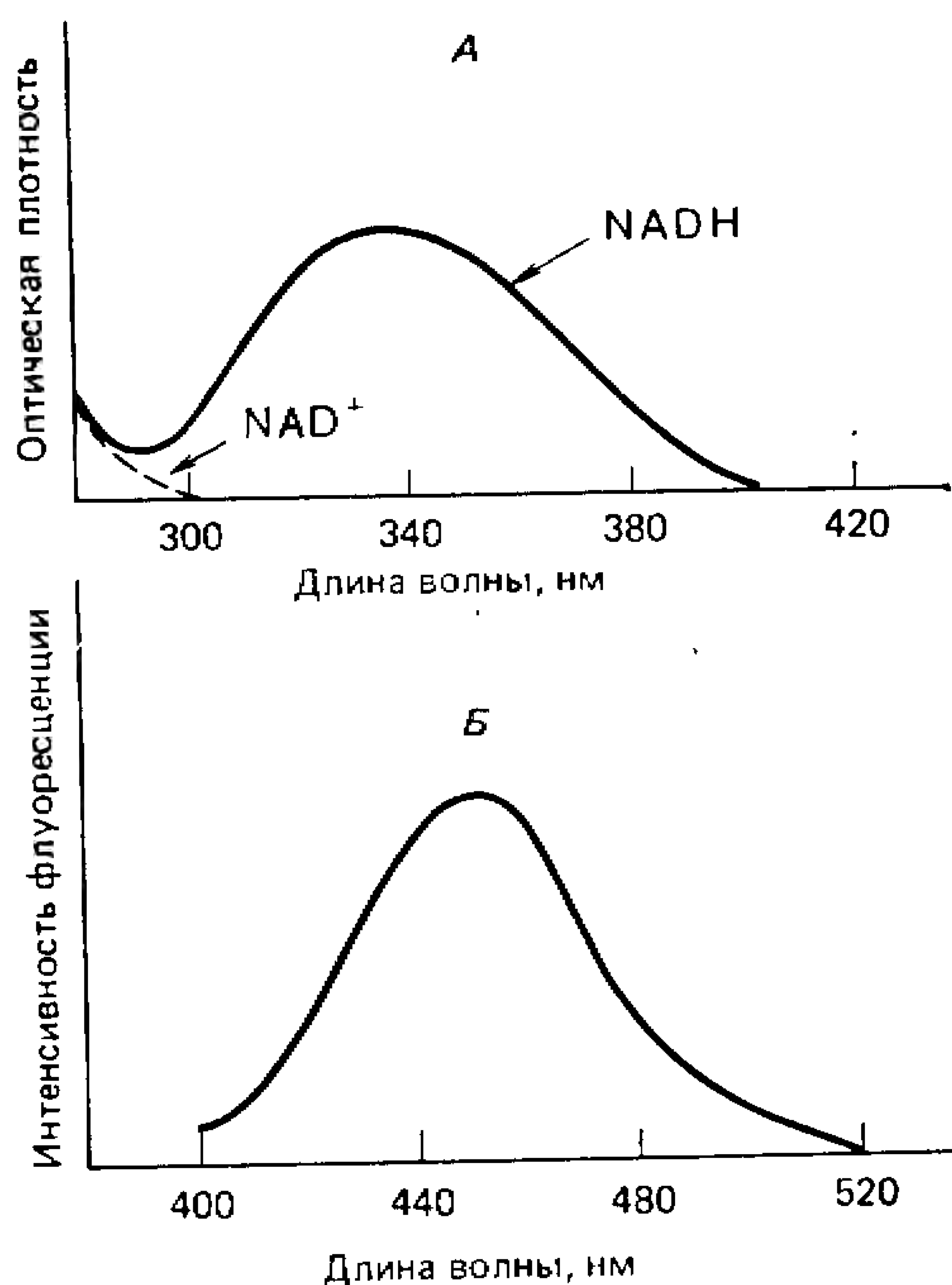


Рис. 8.2. *А*. Спектры поглощения NADH и NAD^+. *Б*. Спектр флуоресценции NADH при возбуждении светом с длиной волны 365 нм.

Если все эти три условия соблюдены, активность фермента можно измерить по образованию NADH. Следует отметить, что в данном случае нет оснований ожидать одинаковой активности, выраженной в абсолютных единицах, при протекании реакции в прямом и обратном направлениях. Для ферментов, катализирующих обратимые реакции в физиологических условиях, активность в обоих направлениях часто бывает сходной. В случае же малатдегидрогеназы максимальная скорость реакции, достигаемая в прямом направлении, примерно в два раза меньше, чем в обратном.

Обычный график зависимости активности фермента от концентрации субстрата — гипербола, асимптотически приближающаяся к V_{max} (рис. 8.1, *А*), — не соответствует кинетическому поведению ферментов, для которых характерны аллостерические эффекты или явление «субстратного ингибирования». В случае аллостерических ферментов условия определения выбирают так, чтобы в смеси присутствовали все необходимые активаторы, а концентрация субстрата была высокой. В этих условиях аллостерические эффекты часто не наблюдаются. Термин *субстратное ингибирование* означает, что фермент проявляет пониженную активность при высоких концентрациях субстрата. Если активность малатдегидрогеназы (см. выше) определя-

ют с помощью реакции, направленной в сторону образования малата, то концентрации оксалоацетата, превышающие 0,2 мM, приводят к снижению скорости реакции из-за образования прочного абортивного комплекса — оксалоацетат — NAD^+ — фермент. В других случаях причины субстратного ингибирования не столь ясны. Дрожжевую пируваткиназу определяют при очень высоких концентрациях субстратов (фосфоенолпирувата и ADP) и активатора (фруктозо-1,6-бисфосфата), а именно при 10 мM концентрации каждого из этих соединений; такая концентрация примерно в 100 раз превышает величину K_M [165]. Однако при 1 мM концентрации каждого из указанных компонентов реакции достигается более высокая активность (и при меньших затратах!). Теперь надо учесть, что 10 мM концентрации фосфоенолпирувата, ADP и фруктозо-1,6-бисфосфата дают раствор с ионной силой, равной 0,26 M, что вместе с присутствующим буфером составляет в целом ионную силу 0,4 M — величину, намного превышающую физиологическую ионную силу. Возможно, что именно это и приводит к кажущемуся «субстратному ингибированию». При работе с субстратами, несущими большое число зарядов, следует учитывать их влияние на ионную силу.

Возможно также, что препарат субстрата содержит ингибитор. Если это конкурентный ингибитор (что бывает чаще всего), то к сожалению, он обнаруживается только при сравнении данного препарата с другим, лучше очищенным препаратом. Математически эту ситуацию можно описать следующим образом.

Для конкурентного ингибирования

$$\frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{K_M}{s}\left(1 + \frac{i}{K_i}\right),$$

где v — наблюдаемая скорость, s — концентрация субстрата, i — концентрация ингибитора, K_i — константа диссоциации фермент-ингибиторного комплекса.

Если ингибитор присутствует в субстрате, то $i \propto s$ и

$$\frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{K_M}{s} + \beta,$$

где β — некая константа.

Если s имеет бесконечно большое значение, то $V_{max}/v = 1 + \beta$, т. е. оба определяемых параметра V_{max} и K_M будут меньше, чем истинные значения, на множитель $1/(1+\beta)$. Однако гиперболическая кинетика будет сохраняться (рис. 8.3).

В случае смешанного неконкурентного ингибирования

$$\frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{K_M}{s} + \frac{i}{K_i} + \frac{K_M}{s}\cdot\frac{i}{K_i'},$$

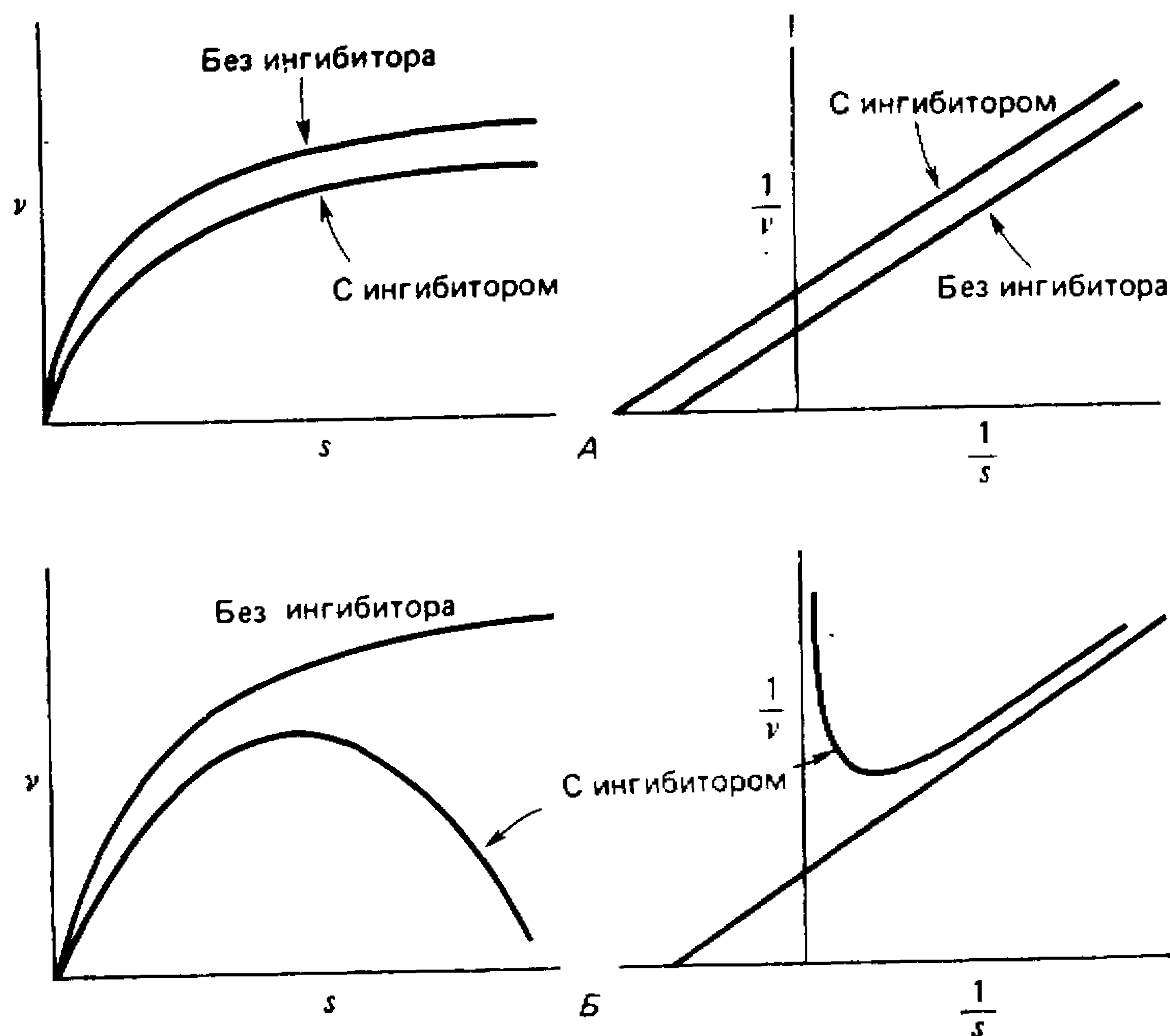


Рис. 8.3. *А*. Влияние конкурентного ингибитора, содержащегося в препарате субстрата, на скорость реакции. *Слева* — график зависимости скорости реакции от концентрации субстрата; *справа* — график зависимости обратных величин. *Б*. То же, что и на рис. *А*, но с неконкурентным ингибитором, содержащимся в субстрате.

где K_i' — константа диссоциации комплекса фермент — субстрат — ингибитор.

Учитывая, что i пропорциональна s, получаем

$$\frac{V_{max}}{v} = 1 + \frac{K_M}{s} + \alpha s + \beta.$$

Следовательно, график зависимости $1/v$ от $1/s$ будет нелинейным, и в ходе реакции будет наблюдаться кажущееся субстратное ингибирование (рис. 8.3).

Примером конкурентного ингибитора, остававшегося в течение долгого времени невыявленным, может служить примесь алюминия в продажных препаратах АТР, из-за которой, как было недавно обнаружено, уровень активности дрожжевой гексокиназы варьирует от препарата к препарату [166]. Комплекс Al—АТР является эффективным конкурентным ингибитором ($K_i \sim 0{,}1$ мкМ), но кинетическая кривая все же сохраняет форму гиперболы: для АТР уменьшаются как V_{max}, так и K_M. Присутствие неконкурентных ингибиторов можно обнаружить, как

это показано выше. Такими ингибиторами могут быть соли, нежелательные ионы металлов, органический растворитель, в котором растворен субстрат, а также, возможно, какие-то другие, трудно выявляемые вещества.

В заключение следует подчеркнуть, что существует ряд трудностей при выборе подходящей концентрации субстрата. Ради экономии иногда можно отступить от соблюдения идеальных условий. Во всяком случае, серийные определения не обязательно должны быть абсолютно верными и точными.

Влияние pH, ионной силы и температуры

Установив, что концентрация субстрата должна быть по возможности не менее чем в 10 раз больше K_M, необходимо указать на зависимость K_M от других факторов, таких, как pH, ионная сила и температура. Эти параметры влияют также и на каталитическую константу скорости $k_{кат}$($V_{max}=k_{кат}\times$общая концентрация фермента). Хотя оптимум pH определяют как значение pH (или интервал значений pH), при котором достигается максимальная активность (максимальная величина V_{max}), снижение активности при изменении pH может быть обусловлено резким возрастанием величины K_M (и, следовательно, снижением степени насыщения фермента субстратом), а не уменьшением V_{max}. Некоторые ферменты при измерении их активности в присутствии высоких концентраций субстрата имеют оптимум pH, сильно отличающийся от физиологического. Например, щелочные фосфатазы, как показывает их название, проявляют максимальную активность в щелочной области pH (10—11), хотя в условиях in vivo они функционируют при pH около 7. Причина заключается в том, что в физиологическом отношении величина K_M гораздо важнее, чем величина V_{max}; в клетке субстраты присутствуют всегда в очень низких концентрациях. Поэтому в данном случае значение K_M при pH 7 намного меньше, чем при pH 10.

Это отступление призвано подчеркнуть необходимость очень осторожного определения «оптимального pH». Для энзимолога оптимум pH — это тот pH, при котором $k_{кат}$(V_{max} имеет наивысшее численное значение, т. е. для него это — величина, независимая от концентрации субстрата. Все эти тонкости несущественны для получения воспроизводимых результатов при определении активности фермента в ходе его очистки. Используя достаточно высокую концентрацию субстрата, можно определить скорости реакции в каком-то интервале значений pH и найти оптимальное значение v (не обязательно V_{max}). При этом очень важна природа буфера, так как многие компоненты буферных растворов изменяют поведение фермента, действуя прямо или

косвенно как ингибиторы. Фосфат или другие многозарядные анионные буферные соединения, такие, как цитрат, могут конкурировать с отрицательно заряженным субстратом, непрочно связываясь с положительно заряженным активным центром фермента. Так как используемые концентрации буфера обычно составляют 10—100 мМ, даже слабая ассоциация ионов с активным центром будет приводить к значительному ингибированию реакции. Важные для активности фермента ионы металлов могут образовывать комплексы с компонентами буфера. Особенно эффективными комплексообразователями являются цитрат и гистидин. Наконец, на активность фермента влияет ионная сила буфера и других содержащихся в растворе солей. Физиологически нормальная ионная сила составляет 0,1—0,2 М. При более низких значениях ионной силы активность ферментов обычно не снижается, однако концентрации соли выше 0,2 М часто подавляют их активность. Поэтому, определяя ферментативную активность в надосадочной жидкости после осаждения сульфатом аммония, не следует брать больших аликвот, если только не установлено, что эта соль не оказывает на фермент ингибирующего действия.

Наконец, необходимо учитывать и температуру, при которой проводится определение. Не существует такого понятия, как оптимальная температура действия фермента; есть лишь оптимальная температура для данного метода тестирования. Скорость ферментативной реакции, как и почти любого другого химического процесса, повышается обычно в 1,5—2,2 раза с повышением температуры на 10 °С (среднее значение 1,8). Однако за то время, которое необходимо для определения ферментативной активности, часть фермента будет потеряна в результате денатурации белка, происходящей при высокой температуре, так что повышение температуры приведет в конечном счете к снижению скорости образования продукта. Чем короче время инкубации, тем выше будет *кажущийся* температурный оптимум, так как при этом меньше белка успеет денатурировать. Типичные кажущиеся оптимумы температуры для определений, занимающих 5—10 мин, составляют 40—60 °С. Гораздо более высокие величины получены для ферментов, выделенных из термофильных микроорганизмов.

Для рутинного тестирования ферментов (за исключением упомянутых выше термофильных ферментов) неудобно и физиологически неоправданно использовать высокие температуры. Более того, желательна определенная стандартизация температуры, при которой проводится определение активности. В химии стандартной температурой долгое время считалась температура 25 °С (298 °К), и сначала эта температура рекомендовалась и для определения ферментов. Однако исследователи, работа-

ющие в тропических районах земного шара (а во времена, предшествовавшие нефтяному кризису, и исследователи США), жаловались, что температура в их лабораториях обычно выше, чем рекомендованная, между тем как системы охлаждения не всегда легкодоступны. Поэтому комиссия по ферментам в руководстве, изданном в 1964 г.[1], предложила в качестве стандартной температуру 30 °C, что было ближе к 37 °C — температуре, при которой функционируют многие ферменты в естественных условиях. Из последующих рекомендаций были изъяты ссылки на температуру, при которой следует определять ферментативную активность, и в последнее время наметилась тенденция вернуться к стандарту в 25 °C. Иногда невозможно или неудобно поддерживать точное значение требуемой температуры. В этих случаях используют поправку — величину Q_{10} (активность при $T+$ $+10$ °C, деленную на активность при T °C), которую легко определить. Если точное значение этой величины для данного фермента не известно, можно использовать $Q_{10}=1{,}8$ (6% на градус). Следует помнить, что K_M может меняться не только в зависимости от pH, но и от температуры, и Q_{10} точно отражает изменения V_{max}, а не v. Не всегда отдают себе отчет, как сильно влияет температура на определяемые величины; иногда студенты стараются во что бы то ни стало снизить ошибку определения ферментативной активности до 1%, но в то же время не знают, какова была точная (хотя бы в пределах нескольких градусов) температура измерений! Чтобы определить ферментативную активность с ошибкой порядка 5%, необходимо знать температуру раствора с точностью до 0,5 °C.

8.2. ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ С ПОМОЩЬЮ ПЕРИОДИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Чтобы измерить активность фермента, необходим метод определения количества образовавшегося продукта (или иногда количества израсходованного субстрата). Такой метод может включать стадию разделения субстратов и продуктов после реакции; можно также измерять концентрацию одного из компонентов смеси независимо от присутствия другого. Удобно разделить способы измерения активности ферментов на две группы: периодические (stopped) и непрерывные методы. Последние будут рассмотрены в следующем разделе. Непрерывные методы позволяют следить за ходом реакции во времени, не прерывая ее течения, что является большим преимуществом. Однако непрерывные методы имеют ряд ограничений, и для многих ферментов нет подходящих способов таких измерений. Периодиче-

[1] Номенклатура ферментов (см. [158]).

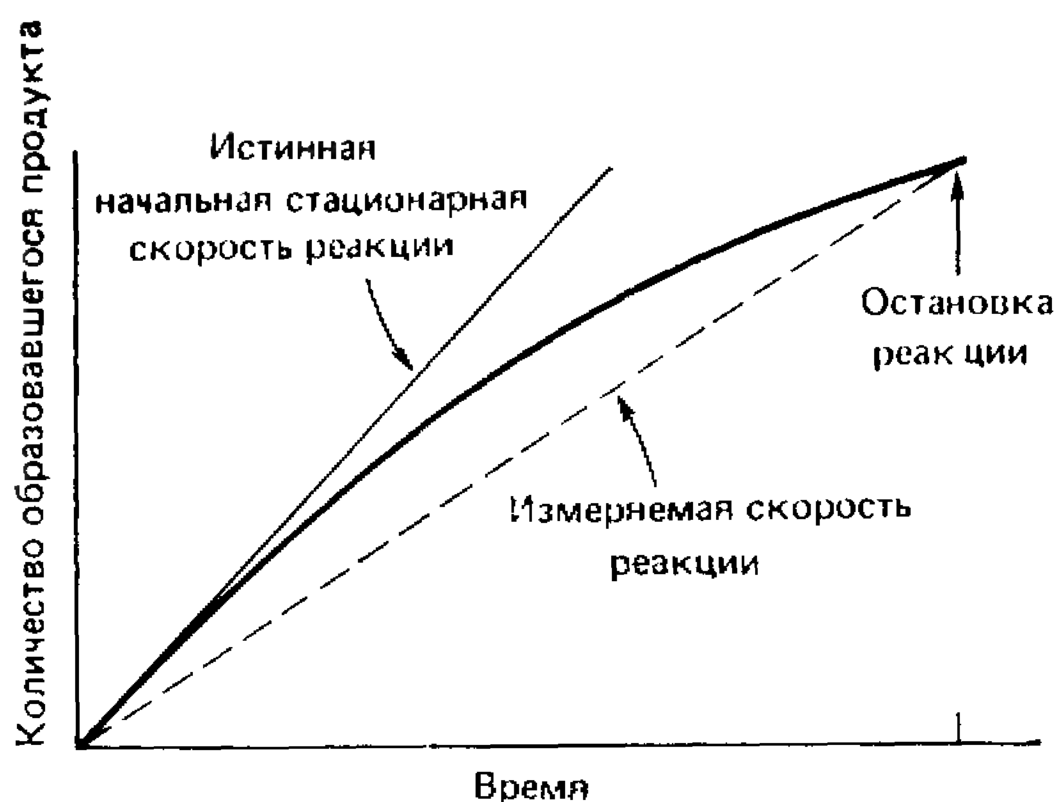


Рис. 8.4. Ход реакции во времени и возможность занижения начальной скорости реакции при периодическом методе тестирования вследствие постепенного замедления реакции.

ские методы можно использовать почти для всех ферментов, но обычно они менее удобны.

При периодическом способе определения активности фермент инкубируют с его субстратом в течение определенного периода времени, и затем реакцию останавливают каким-либо образом. Измеряют количество образовавшегося продукта исходя из предположения, что скорость реакции изменялась линейно в течение всего периода инкубации начиная с нулевого времени. Первое, что нужно проверить при использовании периодического метода, это предположение о линейности. Одна точка может дать заниженное значение начальной стационарной скорости реакции, если к тому времени, когда реакция была остановлена, ее скорость уже снизилась (рис. 8.4). С другой стороны, наличие лаг-периода в ходе ферментативной реакции также даст заниженное значение скорости, если ее определение основано на данных одного измерения. Чтобы проверить линейность изменения скорости реакции, необходимо провести серию инкубаций в течение разных периодов времени. Это особенно важно в случае использования неочищенных экстрактов тканей, так как при этом возможны многие побочные реакции. В результате продукт ферментативной реакции, который пытаются определить, может подвергнуться превращению под действием другого, следующего в метаболической цепи фермента. Более подробное обсуждение методов определения ферментативной активности в сырых тканевых экстрактах приводится в работе [167].

Условия инкубации

Для периодических методов нет ограничений в отношении условий инкубации реакционной смеси. Следует подобрать оптимальное значение pH, но иногда предпочтительнее работать

при рН, несколько отличающемся от оптимального, чтобы сдвинуть равновесие реакции в нужную сторону. Температура легко поддается контролю, и объем реакционной смеси может быть очень небольшим (обычно 50—100 мкл), что позволяет экономно расходовать реактивы. Образец фермента при быстром перемешивании добавляют к остальным компонентам реакционной смеси, и этот момент считают нулевым временем. Реакция продолжается в течение какого-то определенного времени, а затем ее останавливают. Для стабилизации разбавленных растворов ферментов в реакционную смесь часто вводят бычий сывороточный альбумин (0,2—1 мг/мл).

Способы остановки реакции

Ферментативную реакцию останавливают каким-либо способом, который или приводит к мгновенной денатурации фермента, или изменяет условия так, что фермент утрачивает активность, но не обязательно денатурирует. Наиболее часто используемые способы остановки реакции заключаются в подкислении пробы (обычно трихлоруксусной или надхлорной кислотой), что вызывает осаждение белка, или в быстром ее нагревании. Последний способ имеет некоторые преимущества, особенно тогда, когда разбавление образца нежелательно. Однако нагревание должно быть очень быстрым. Пробы очень небольшого объема, помещенные в тонкостенные пробирки (не пластиковые), нагреваются в кипящей водяной бане за 1 с до 90 °С; этого вполне достаточно для денатурации большинства ферментов. Скорость денатурации должна быть настолько высокой, насколько необходимо, чтобы фермент мог полностью инактивироваться за эту секунду. В противном случае неденатурировавшая часть фермента будет реагировать очень быстро и дополнительно даст значительное количество продукта. Это особенно важно, если для определения активности используют короткое время инкубации. Денатурацию нагреванием лучше применять в случае длительной инкубации реакционной смеси (>10 мин). При этом дополнительное количество продукта, образовавшегося в ходе нагревания, будет относительно небольшим.

Трихлоруксусная и надхлорная кислоты при конечной концентрации 3—5% немедленно останавливают реакцию, так как после добавления их к реакционной смеси значение рН снижается почти до нуля, в результате чего белок денатурирует и выпадает в осадок. После удаления осадка путем центрифугирования иногда приходится нейтрализовать надосадочную жид-

кость перед измерением количества продукта. Для этого используют КОН, содержащий небольшое количество K_2CO_3. Бóльшая часть надхлорной кислоты при этом удаляется, так как образовавшаяся соль $KClO_4$ трудно растворима, особенно при 0 °С. Однако трихлорацетат калия остается в растворе. Карбонат удобен тем, что он обладает буферным действием в области нейтральных значений pH; благодаря этому не происходит слишком сильного повышения pH, а значит, и разложения неустойчивых в щелочной среде продуктов реакции. Можно вводить в смесь индикатор типа бромтимолового синего, если есть уверенность в том, что он не мешает измерению количества продукта. Некоторые кислотоустойчивые ферменты не полностью осаждаются этими кислотами и при нейтрализации могут реактивироваться. Среди прочих к таким ферментам относятся аденилаткиназа и АТР-аза из картофеля. Контрольное измерение после остановки реакции в нулевое время позволяет выявить подобную реактивацию. Такое измерение следует делать во всех случаях, поскольку оно дает истинную нулевую точку для отсчета. Измеряемое вещество (продукт реакции) может содержаться или в образце фермента, или в реактивах, что приведет к неправильной точке отсчета.

Еще один очень хороший способ остановки реакции (опять-таки при условии, что он не влияет на дальнейшие измерения) состоит в добавлении к реакционной смеси додецилсульфата натрия в концентрации около 1%. Большинство ферментов быстро денатурирует под действием этого детергента, но остается в растворе.

Для остановки реакции можно также использовать способы, не вызывающие денатурации белков, в тех случаях, когда есть уверенность, что дальнейшие манипуляции не приведут к созданию условий, способствующих возобновлению реакции. Например, фермент, активный только при pH ниже 8, можно инактивировать, если довести pH до 9, а затем поддерживать это значение pH во время измерений. Фермент, функционирующий только в присутствии ионов двухвалентных металлов, инактивируется при добавлении избытка этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА). Но при этом надо убедиться, что в присутствии этого вещества продукт реакции можно сразу же измерить или сначала выделить его из реакционной смеси. При измерениях ферментативной активности радиохимическими методами реакцию можно останавливать, разбавляя смесь немеченым субстратом; в результате будет дополнительно образовываться очень мало радиоактивного продукта. Можно также добавлять большой избыток какого-либо известного ингибитора фермента. Существует много способов остановки ферментативных реакций, пригодных только для данного конкретного фермента.

Измерение количества продукта

Нет никаких ограничений в выборе метода, с помощью которого можно измерить количество продукта, если при остановке реакции в инкубационную смесь не внесены какие-то вещества, мешающие таким измерениям. Методы, применяемые для измерения продуктов реакции, можно разделить на три основные группы — энзиматические, химические и радиохимические методы.

В энзиматических методах используются очищенные ферменты, под действием которых продукт прямо или косвенно превращается в соединение, количество которого поддается измерению. Чаще всего применяются спектрофотометрические и флуориметрические методы, однако есть и много других способов (например, биолюминесценция, образование газообразных соединений). При использовании того или иного энзиматического метода его обычно приспосабливают к непрерывным,

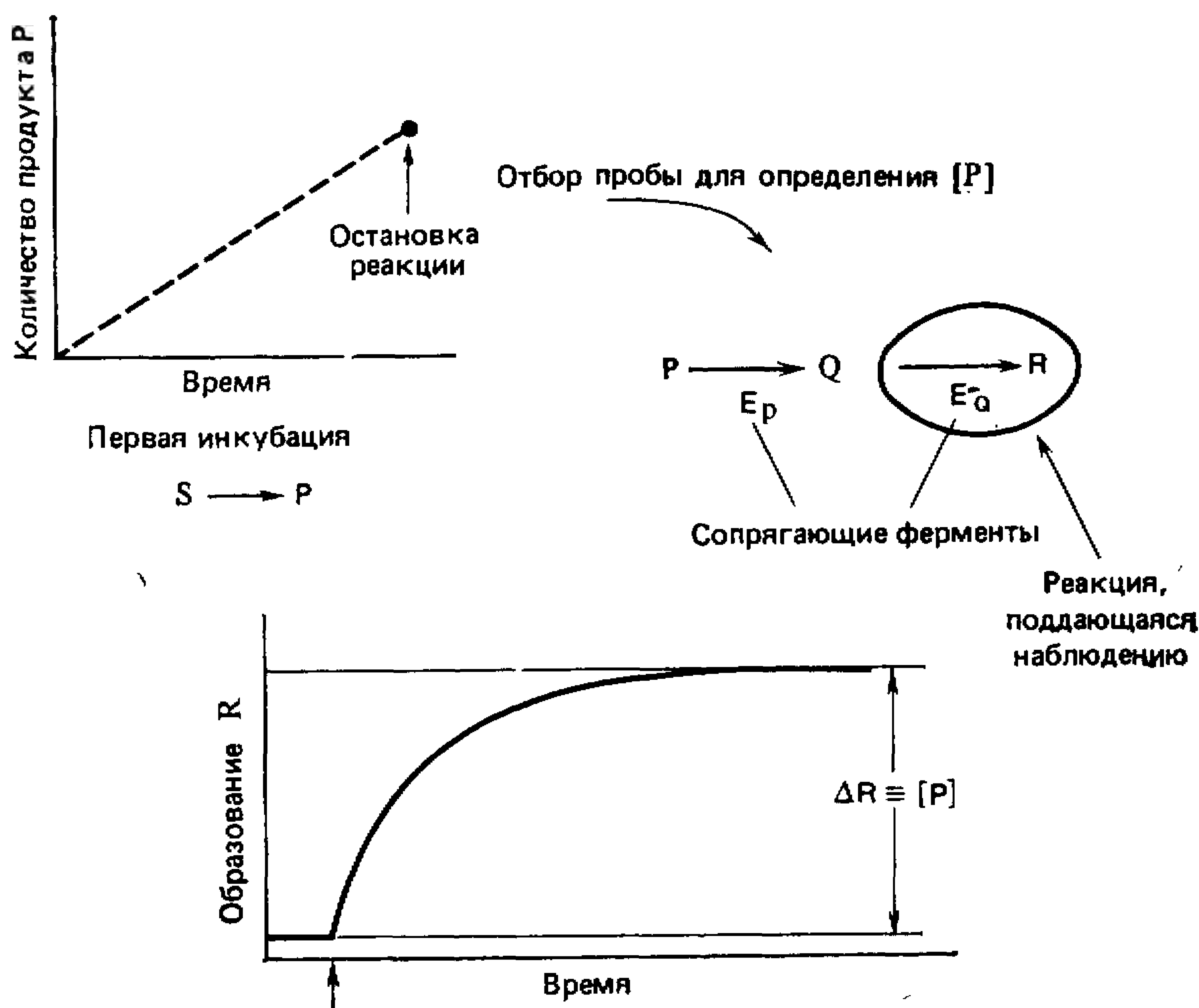


Рис. 8.5. Схема измерения ферментативной активности с помощью периодического метода и последующего определения продуктов реакции ферментативным путем.

а не периодическим способам регистрации. Но иногда периодические способы оказываются более удобными, более точными или более дешевыми. Поскольку ферменты обладают специфичностью по отношению к субстратам, в данном случае не возникает необходимости отделять продукты от реактантов. Продукт подвергают действию одного или нескольких ферментов и реакцию стараются довести до конца. Так как активности добавляемых ферментов не нужно «согласовывать» с активностью определяемого фермента, как это делается в непрерывных методах (ср. разд. 8.3), можно использовать значительно меньшие количества ферментов, с тем чтобы реакция могла спокойно продолжаться от 10 мин до 1 ч если это необходимо. Для энзиматического анализа метаболитов требуются такие количества фермента, которых достаточно для практически полного завершения реакции за приемлемое время. Можно показать, что для 98—99%-ного завершения реакции за 10 мин минимальное количество единиц фермента в одном миллилитре раствора (V_{max}) определяется уравнением $V_{max}/K_M = 1$ мин$^{-1}$ [168], где K_M — константа Михаэлиса для сопрягающего фермента по отношению к соответствующему субстрату. Методика измерений схематически показана на рис. 8.5.

В качестве примера рассмотрим определение фруктозо-бисфосфатазы в присутствии P_i.

Первая инкубация:

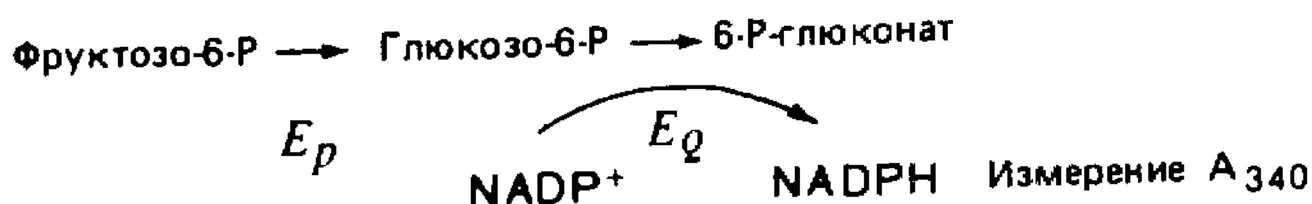
Образец + фруктозо-1,6-бисфосфат + P_i + активаторы, ингибиторы и т. д.

Остановка реакции

Измерение количества фруктозо-6-фосфата (P на рис. 8.5)

E_P — фосфоглюкозоизомераза

E_Q — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа + $NAD(P)^+$



Так как K_M для E_P по отношению к фруктозо-6-Р равно 0,2 мМ, необходимо, чтобы количество фермента удовлетворяло по крайней мере следующему равенству: $V_{max}{}^P = 0{,}2 \times 1 = 0{,}2$ ед.$\times$мл$^{-1}$. Поскольку первая реакция обратима, следует взять несколько больше фермента, например 0,5 ед.·мл$^{-1}$.

Если K_M для E_Q по отношению к глюкозо-6-Р составляет 0,1 мМ, фермента нужно не менее $V_{max}{}^Q = 0{,}1 \times 1 = 0{,}1$ ед.·мл$^{-1}$. Из-за того что второй фермент может не быть насыщенным $NADP^+$, лучше взять вдвое больше фермента — 0,2 ед.·мл$^{-1}$.

Определение фруктозо-бисфосфатазы можно проводить и в непрерывном режиме, однако в этом случае следует брать *по крайней мере* в 5 раз больше сопрягающих ферментов (см. разд. 8.3).

Нельзя дать общих рекомендаций по определению продукта P, так как для этого используются самые разные способы. Если невозможно измерить P в присутствии остаточных количеств субстрата S (из-за того, что оба имеют сходную структуру), возникает необходимость в использовании методов разделения. Разделение всегда требуется, если применяются радиохимические методы, которые будут обсуждаться ниже. Если же разделения не требуется, химические реактивы можно добавлять прямо в раствор после остановки реакции, причем часто без предварительной нейтрализации этого раствора (в тех случаях, когда для остановки реакции используется подкисление). Как указывалось выше, при денатурации белков додецилсульфатом натрия не происходит образования белкового осадка. Поэтому удобно, например, измерять содержание фосфата, останавливая реакцию додецилсульфатом натрия и добавляя затем не осаждающий белки кислый молибдатный реактив (вместо обычно применяемой надхлорной кислоты в этом случае используют серную). Додецилсульфат натрия не влияет на образование фосфатсодержащих окрашенных продуктов, и белок не выпадает в осадок.

Радиохимические методы основаны на обнаружении меченых продуктов реакции, которые должны быть полностью отделены от оставшегося меченого субстрата. Разделение — это обычно наиболее длительная стадия, которая вносит наибольшую ошибку в конечный результат. Продукт можно отделить от реагента по принципу фазового разделения, например осаждая меченый белок из раствора, содержащего реагент, или удаляя меченый CO_2 из смеси; принцип метода достаточно прост, хотя существует много практических трудностей. В других случаях необходимы хроматографические методы. Для этого используют хроматографию на бумаге или в тонком слое, ионообменную хроматографию или жидкостную хроматографию высокого разрешения. Иногда эти процедуры протекают очень быстро и просто, особенно в ситуациях «все или ничего», когда какой-либо один компонент пары продукт — реагент полностью сорбируется на носителе, а второй не сорбируется вовсе. Но бывает и так, что разделение идет с трудом, особенно тогда, когда в смеси присутствует в большом избытке субстрат. Из-за обычной диффузии может произойти перекрывание зоны субстрата с зоной продукта, и тогда содержание продукта будет ошибочно завышено, если не будут поставлены соответствующие контрольные пробы (рис. 8.6).

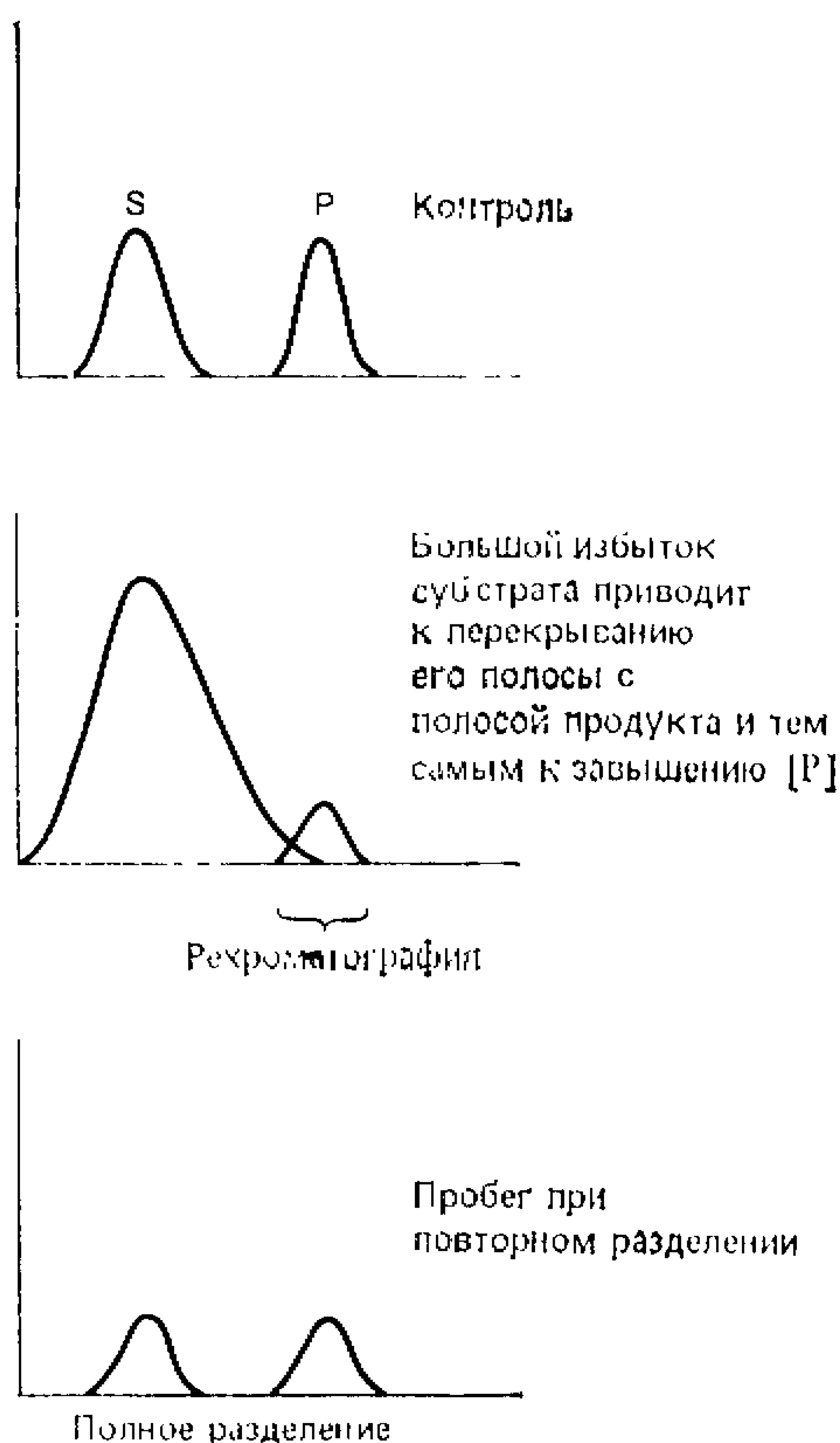


Рис. 8.6. Трудности, возникающие при хроматографическом разделении субстрата и продукта реакции.

Жидкостная хроматография высокого разрешения позволяет достичь разделения, в значительной степени устраняющего описанные выше проблемы. Во многих случаях не возникает даже необходимости использовать меченый субстрат, так как даже очень малые количества продуктов реакции можно измерить непосредственно методами рефрактометрии или УФ-поглощения. Эта техника используется все шире для трудноопределимых веществ, требующих высокоэффективных методов разделения.

Суммируя все изложенное в этом разделе, можно сказать, что периодические методы имеют свои достоинства и недостатки по сравнению с непрерывными методами (для сравнения см. табл. 8.3). Для рутинных анализов непрерывные методы благодаря их быстроте и легкости выполнения предпочтительны, при условии что такие методы существуют и имеют достаточную чувствительность. Радиохимические методы основаны на применении периодического принципа и обычно (но не всегда) обладают самой высокой чувствительностью.

8.3. ИЗМЕРЕНИЕ АКТИВНОСТИ НЕПРЕРЫВНЫМИ МЕТОДАМИ

Под непрерывными методами определения ферментативной активности подразумеваются такие методы, которые позволяют непрерывно следить за ходом реакции, начиная от нулевого времени и до ее завершения, причем обычно производится мгновенная регистрация данных. Есть довольно большая группа ферментов, у которых образование продукта реакции или убыль субстрата можно наблюдать непосредственно вследствие того, что существует различие в спектре поглощения между продуктом и субстратом. Кроме того, суммарным результатом реакции может быть образование кислоты или основания, изменение вязкости или даже выделение тепла. Эти явления также можно регистрировать непосредственно. К важнейшим ферментам этого типа относятся дегидрогеназы, использующие NAD или NADP, многие гидролазы, расщепляющие синтетические

Таблица 8.2. Примеры несопряженных непрерывных методов, используемых для определения ферментов

Фермент	Реакция	Наблюдение
Лактатдегидрогеназа (1)	Лактат+NAD^+⟶Пируват++NADH+H^+ (высокий pH)	Образование NADH по поглощению при 340 нм
Лактатдегидрогеназа (2)	NADH+Пируват+H^+⟶Лактат+NAD^+	Расход NADH по поглощению при **340 нм** 405 нм
Неспецифические фосфатазы	NO_2-⬡-O-Ⓟ ⟶ NO_2-⬡-OH + P_i	Образование нитрофенола по поглощению при 405 нм
Гликозидазы	Метилумбеллиферилглюкозид⟶Сахар+Метилумбеллиферон	Флуоресценция метилумбеллиферона
Ксантиноксидаза	Ксантин+O_2⟶Мочевая кислота+Супероксид	Образование мочевой кислоты по поглощению при 295 нм
Эндоцеллюлаза	Целлюлоза⟶Олиго-β-глюкосахариды	Снижение вязкости
Гексокиназа	Глюкоза+$MgATP^{2-}$⟶Глюкозо-6-P^{2-}+$MgADP^-$+H^+ (высокий pH)	Образование кислоты (pH-стат)
Химотрипсин	*п*-Нитрофениловый эфир N-t-BOC-L-фенилаланина⟶N-t-BOC-L-фенилаланин+*п*-Нитрофенол	Образование нитрофенола по поглощению при 405 нм

Примечание. Для некоторых из приведенных ферментов периодические методы более чувствительны, так как максимальное поглощение или флуоресценция наблюдаются при pH, отличающемся от оптимума pH фермента.

субстраты с образованием окрашенных или флуоресцирующих продуктов, а также эндогидролазы, действие которых на субстраты сопровождается снижением вязкости. Теоретически за любой ферментативной реакцией, в ходе которой происходит заметно отличающееся от нуля изменение энтальпии, можно проследить с помощью имеющихся в продаже чувствительных калориметров. Хотя калориметрическое определение ферментов распространено не очень широко, его можно применять в тех случаях, когда другие методы непригодны. Все эти методы, о которых говорилось выше, можно назвать «несопряженными непрерывными» методами определения, чтобы отличить их от сопряженных способов, описанных ниже. Некоторые примеры несопряженных непрерывных методов приведены в табл. 8.2.

Сопряженные методы

Принцип сопряженных методов заключается в том, что продукт реакции, который нельзя обнаружить непосредственно, выделяется и подвергается химическому или ферментативному превращению прямым или косвенным путем в соединение, которое можно выявить тем или иным способом. Добавляемые реактивы, конечно, должны действовать в тех же условиях (pH, температура и т. д.), что и фермент, активность которого измеряется, и не должны влиять на ферментативную активность. В большинстве методов используется свойство ферментов проявлять специфичность по отношению к определенному веществу, что позволяет избирательно воздействовать на продукт и продолжить «мини-цепь» метаболических превращений до тех пор, пока не получится вещество, которое можно определить каким-либо способом. Однако имеется несколько прямых хими-

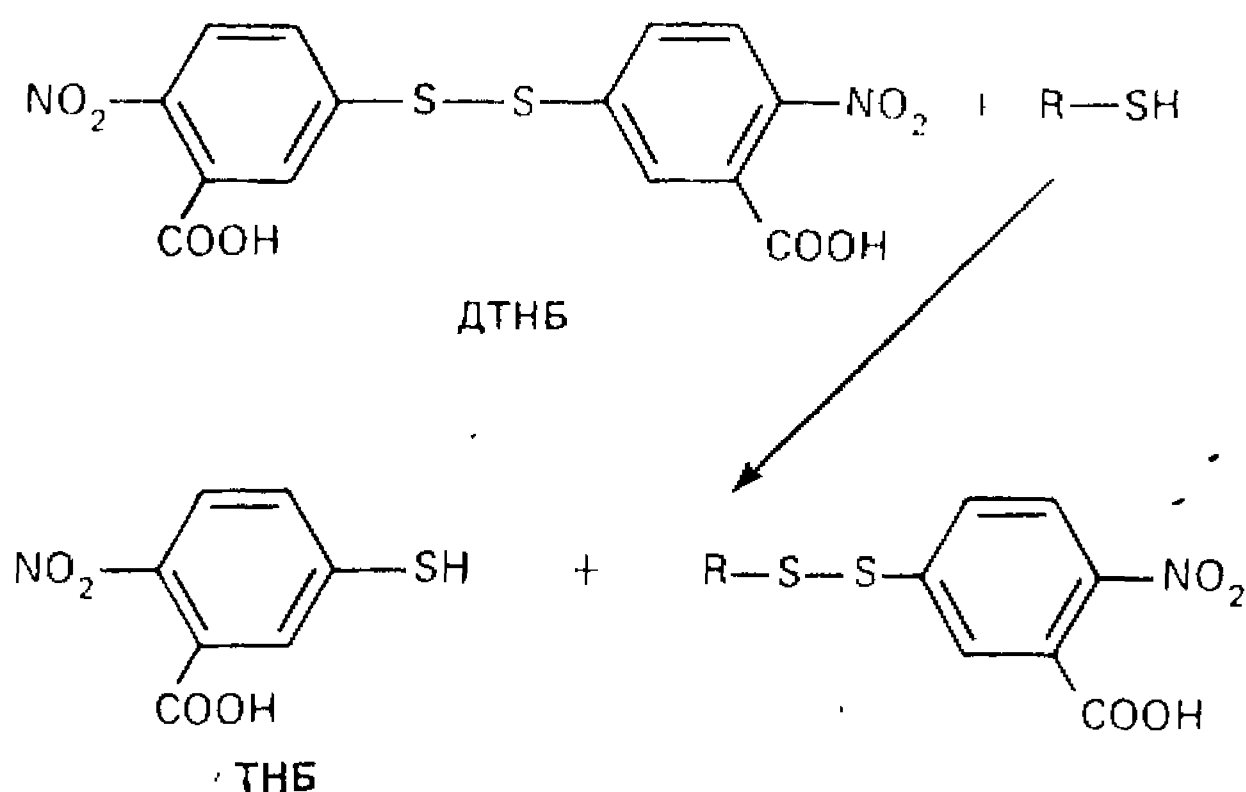
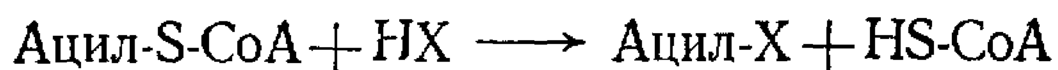
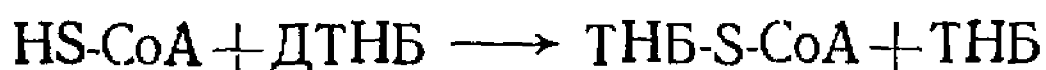


Рис. 8.7. Реакция ДТНБ с сульфгидрильными соединениями, приводящая к образованию окрашенного продукта.

ческих методов, включающих реакцию, в которой образуется окрашенное вещество. Особое значение имеет 5,5′-дитиобис(2-нитробензойная) кислота (ДТНБ), реагирующая в нейтральной области pH с сульфгидрильными группами с выделением 5-тио-2-нитробензойной кислоты (ТНБ), за которой можно наблюдать при 412 нм (рис. 8.7). Этим способом можно определять ферменты, использующие ацил-СоА и образующие СоА:



Ацил-S-СоА + HX ⟶ Ацил-X + HS-СоА



HS-СоА + ДТНБ ⟶ ТНБ-S-СоА + ТНБ

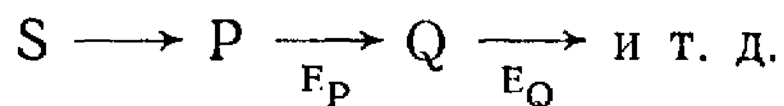
Однако ферменты, содержащие реакционноспособные сульфгидрильные группы в активном центре, будут, скорее всего, инактивироваться этим реактивом.

Другой пример — это реакции переноса электронов такими ферментами, как гидрогеназы: поглощение кислорода и перенос электрона на флаводоксины или ферредоксины можно наблюдать, используя синтетическое соединение и метилвиологен. Поглощение этого вещества в УФ-свете существенно снижается при его восстановлении:



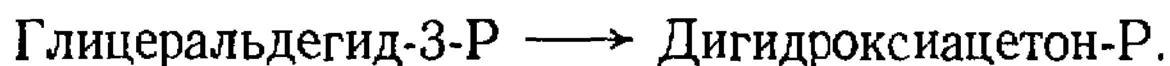
$1/2H_2$ ⟶ $[e^-] + H^+$ ⟶ Ферредоксин ⟶ Метилвиологен

Имеется ряд других примеров сопряженных химических реакций. Однако в непрерывных методах определения активности ферментов значительно шире используются сопряженные ферментативные реакции. Принцип здесь прост, однако встречается много «подводных камней», особенно при использовании этого метода для определения активности в сыром экстракте. Продукт P превращается сопрягающим ферментом E_P в другой продукт Q:



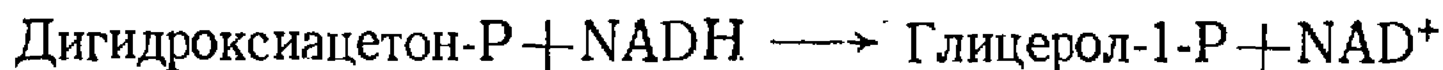
$$S \longrightarrow P \xrightarrow[E_P]{} Q \xrightarrow[E_Q]{} \text{и т. д.}$$

В простейшем случае можно прямо следить за реакцией, катализируемой ферментом E_P. Например, нужно измерить активность фермента триозо-Р-изомеразы:



Глицеральдегид-3-Р ⟶ Дигидроксиацетон-Р.

Образование продукта — дигидроксиацетонфосфата — нельзя измерить прямым способом. Его удаляют с помощью фермента глицерол-1-Р-дегидрогеназы, для действия которого необходим NADH:

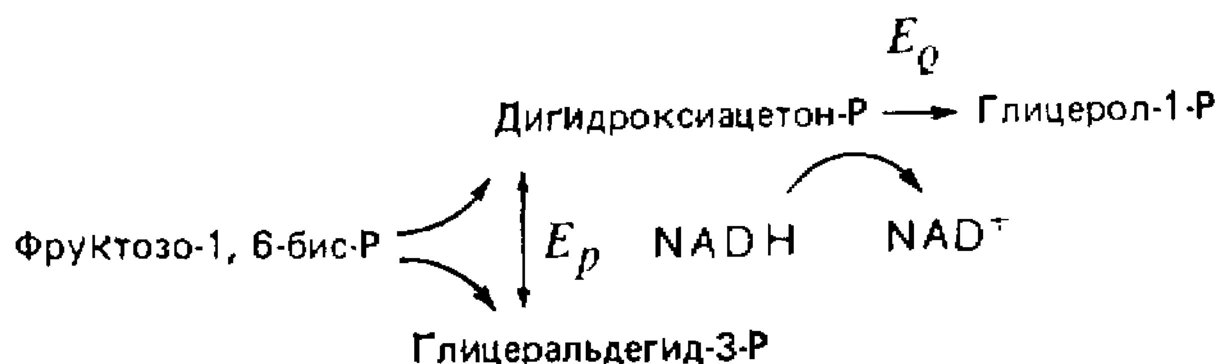


Дигидроксиацетон-Р + NADH ⟶ Глицерол-1-Р + NAD^+

Хотя продукт этой реакции, глицерол-1-Р, нельзя измерить непосредственно, образование каждой его молекулы сопровождается расходованием молекулы NADH, что приводит к сни-

жению поглощения при 340 нм. Сопрягающий фермент, глицерол-1-Р-дегидрогеназа, служит в этом случае «индикаторным ферментом».

Теперь разберем более сложный процесс, в котором, однако, участвуют те же ферменты. Фруктозо-бисфосфатальдолазу обычно определяют с использованием как триозо-Р-изомеразы в качестве сопрягающего фермента (E_P), так и глицерол-1-Р-дегидрогеназы (E_Q) в качестве индикаторного фермента:



Можно было бы утверждать, что фермент E_P не нужен, так как дигидроксиацетон-Р уже образовался в альдолазной реакции. Однако добавление E_P имеет не только то преимущество, что чувствительность измерения при этом удваивается: оно также вносит уверенность в том, что эндогенная изомераза, которая может содержаться в образце, не исказит результатов из-

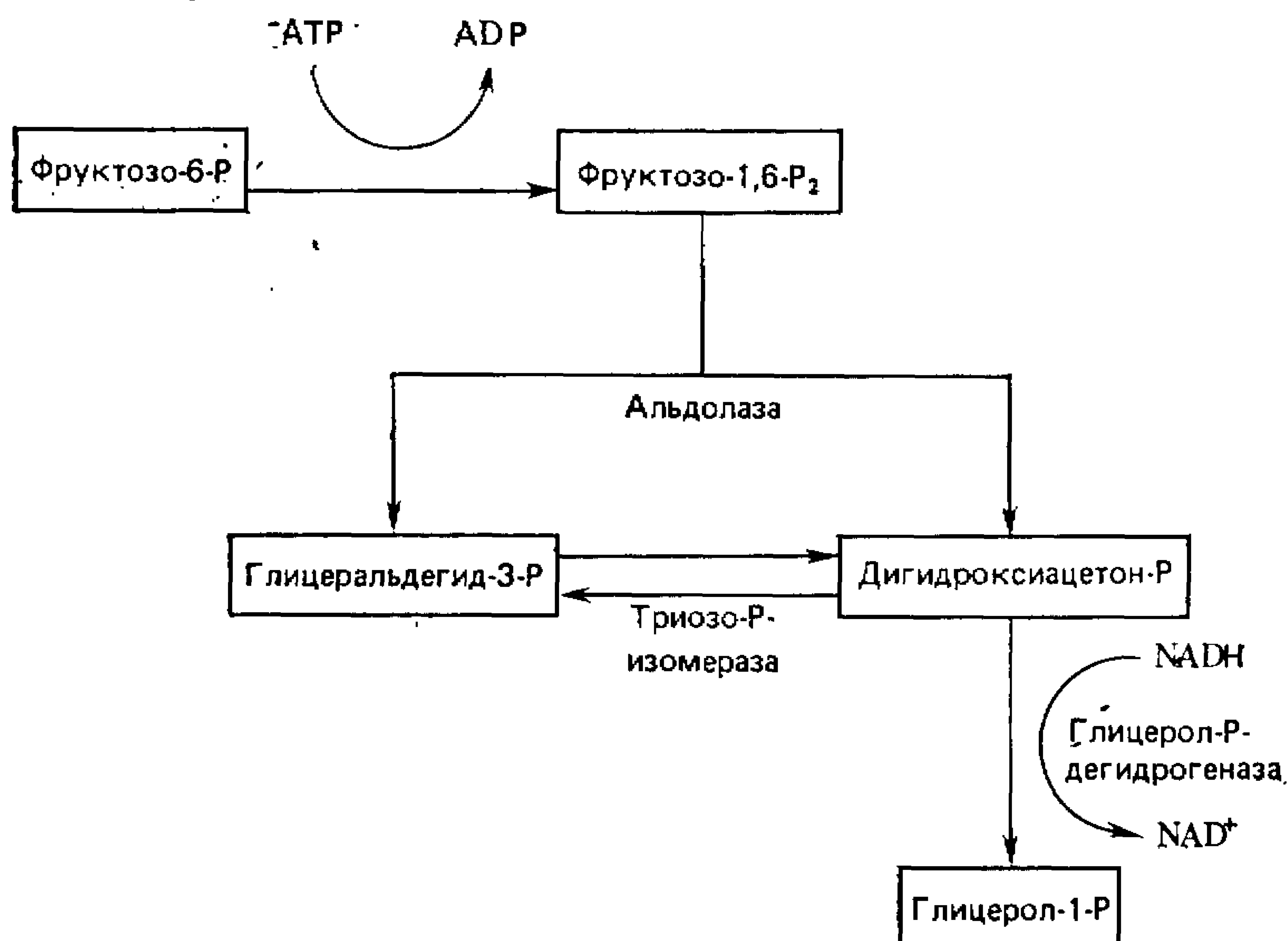


Рис. 8.8. Принцип сопряженного определения фосфофруктокиназы с использованием глицерол-1-Р-дегидрогеназы в качестве индикаторного фермента.

мерения. Без избытка триозо-Р-изомеразы число молекул NADH, окисляемых на одну молекулу расщепляемого фруктозо-1,6-бис-Р, может изменяться от 1 до 2, вследствие чего будет наблюдаться нелинейность скорости окисления NADH.

Еще более сложным, но очень эффективным методом является метод определения фосфофруктокиназы. Используя ту же последовательность реакций, что и выше, но с альдолазой в качестве сопрягающего фермента, получают две окисленные молекулы NADH на каждую молекулу претерпевающего превращения субстрата (рис. 8.8).

Эти примеры показывают, как можно создать «мини-метаболическую» последовательность реакций для определения активности фермента. Система должна быть термодинамически выгодной, чтобы продукт мог удаляться достаточно эффективно.

Иногда используют более чем одно определение. Например, фосфофруктокиназу определяют, применяя общие методы тестирования ADP с помощью пируваткиназы и лактатдегидрогеназы (рис. 8.9).

Этим способом можно измерять активность большинства киназ, заменяя фруктозо-6-Р подходящим субстратом.

Принцип такого определения ясен. На практике возникают по крайней мере четыре вопроса:

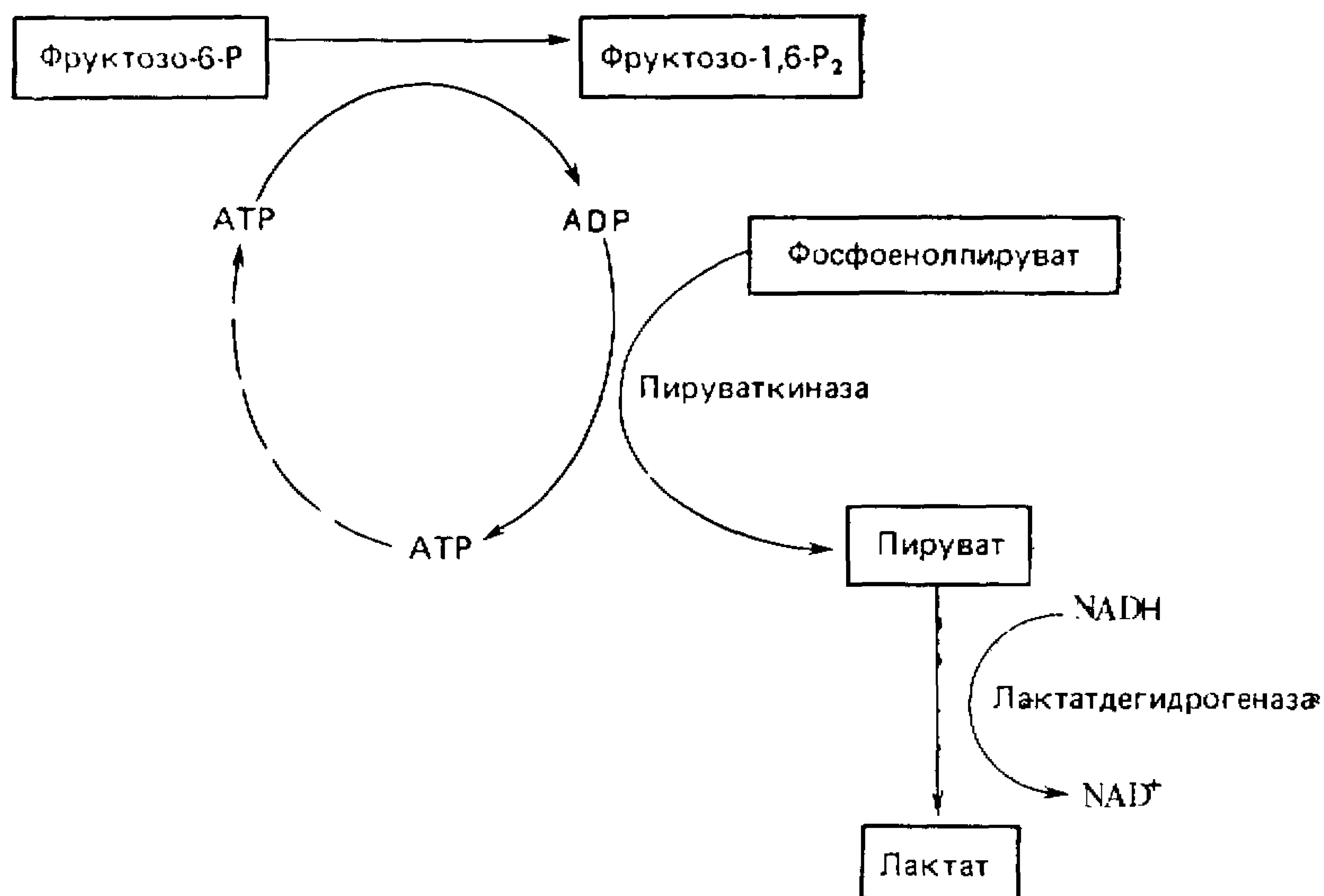


Рис. 8.9. Принцип сопряженного определения фосфофруктокиназы с использованием лактатдегидрогеназы в качестве индикаторного фермента.

1) Сколько нужно взять сопрягающего фермента, чтобы быть уверенным, что катализируемая им реакция не является этапом, лимитирующим скорость всего процесса?
2) Доступен ли сопрягающий фермент в достаточном количестве?
3) Нет ли в сопрягающем ферменте примесей (особенно того фермента, активность которого измеряется)?
4) В какой степени могут другие ферменты, присутствующие в определяемом образце, искажать данные измерений?

Рассмотрим сначала вопрос о количестве необходимого фермента. Если ответы на вопросы 2 и 3 будут соответственно «да» и «нет», то для решения вопроса 1 нужно будет использовать большое количество сопрягающего фермента, чтобы создать такие условия, в которых общая скорость реакции лимитировалась бы определяемым ферментом. Метод проб и ошибок может помочь в этом отношении, но если сопрягающие ферменты сто́ят дорого, то важно знать, какое минимальное их количество необходимо. Часто в опубликованных методах рекомендуются неоправданно большие количества сопрягающих ферментов, которые могут иметь только хорошо финансируемые исследователи. Основной принцип заключается в том, что необходимо достичь стационарного состояния, при котором скорость реакции, катализируемой индикаторным ферментом, равна скорости реакции с участием определяемого фермента. Теоретически этого, однако, нельзя достичь, а можно лишь асимптотически приближаться к такому состоянию. Поэтому, во-первых, следует решить, насколько близко хотелось бы приблизиться к этому состоянию и за какой период времени. Типичное спектрофотометрическое определение занимает несколько минут; при измерении объемов с помощью пипеток и регистрации данных в приборе точность определения редко бывает выше чем $\pm 2\%$. Если мы ограничим наши требования и удовлетворимся тем, что через 1 мин после запуска реакции достигается 98% истинной скорости, то количество нужного нам фермента не будет слишком большим.

Чтобы вычислить необходимое количество сопрягающего фермента, следует сначала определить подходящую для данного случая скорость процесса. Для NADH величина ΔA_{340}, составляющая около 0,2 мин$^{-1}$, вероятно, будет оптимальной (более высокая скорость может привести к тому, что NADH израсходуется прежде, чем будет достигнут заданный 98%-ный предел).

В простой сопряженной системе, показанной на рис. 8.10, продукт P накапливается как раз в достаточном количестве, чтобы фермент E_P мог функционировать с той же скоростью.

Скорость $\Delta A_{340} = 0{,}2$ мин$^{-1}$ эквивалентна примерно 0,03 ед.·мл$^{-1}$. В стационарном состоянии величина [P] очень мала; однако определен-

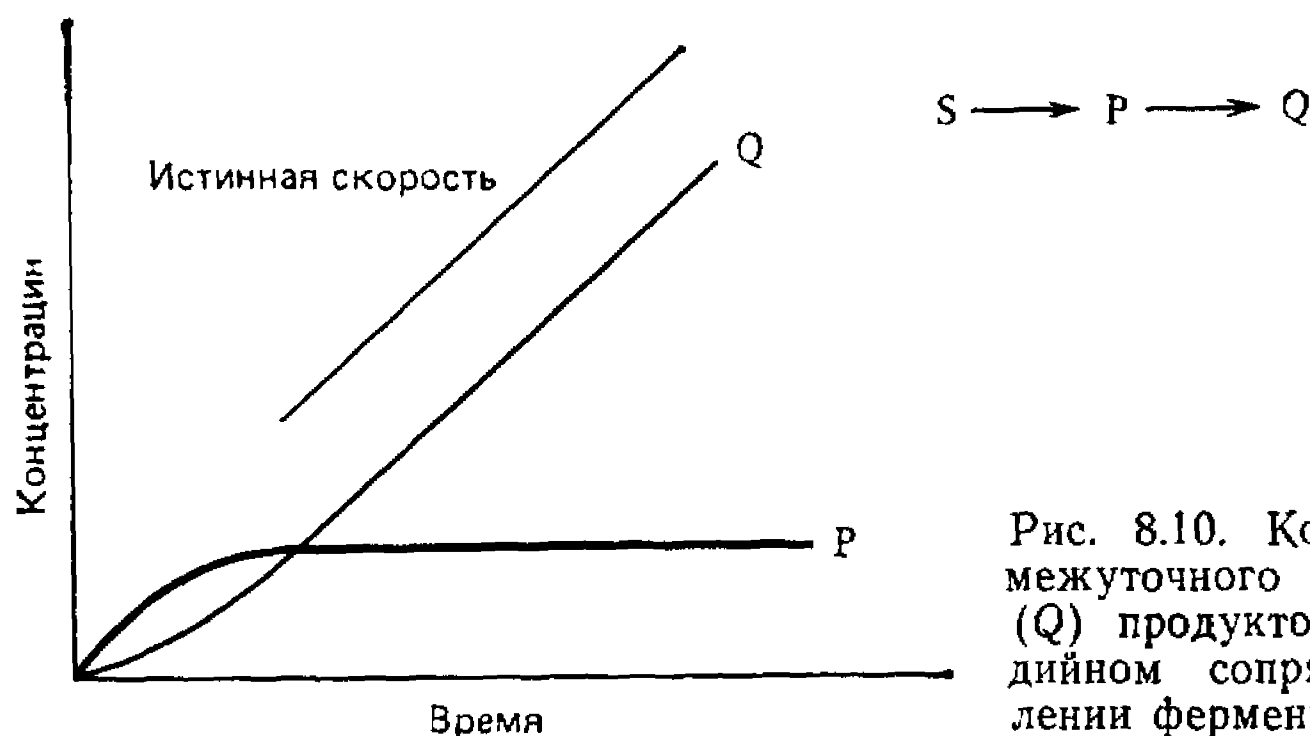


Рис. 8.10. Концентрации промежуточного (*P*) и конечного (*Q*) продуктов при одностадийном сопряженном определении фермента.

ное количество Р должно присутствовать, иначе фермент вообще не будет работать. Если $[P] \ll K^P_M$ (константа Михаэлиса для фермента E_P по отношению к продукту Р), то скорость реакции, катализируемой E_P, будет

$$v = \frac{V_{max}[P]}{K_M^P}.$$

Через промежуток времени t после начала реакции образуется [P] и

$$\frac{d[P]}{dt} = r - \frac{V_{max}[P]}{K_M^P},$$

где r — скорость реакции, катализируемой определяемым ферментом; она является постоянной величиной, так как фермент насыщен субстратом.

Интегрируя это уравнение, получаем

$$\int_0^{[P]} \frac{d[P]}{r - \frac{V_{max}[P]}{K_M^P}} = \int_0^t dt,$$

$$\ln\left[\frac{r}{r - \frac{V_{max}[P]}{K_M^P}}\right] = \frac{V_{max}t}{K_M^P}.$$

Теперь, чтобы найти условия, когда v составляет 98% от r, используем следующее уравнение:

$$\frac{V_{max}[P]}{K_M^P} = 0,98r;$$

следовательно,

$$\ln\left[\frac{r}{r - 0,98r}\right] = \frac{V_{max}t}{K_M^P} = \ln 50 = 3,9.$$

При $t = 1$ мин получим $\frac{V_{max}}{K^P_M} = 3,9$ мин$^{-1}$.

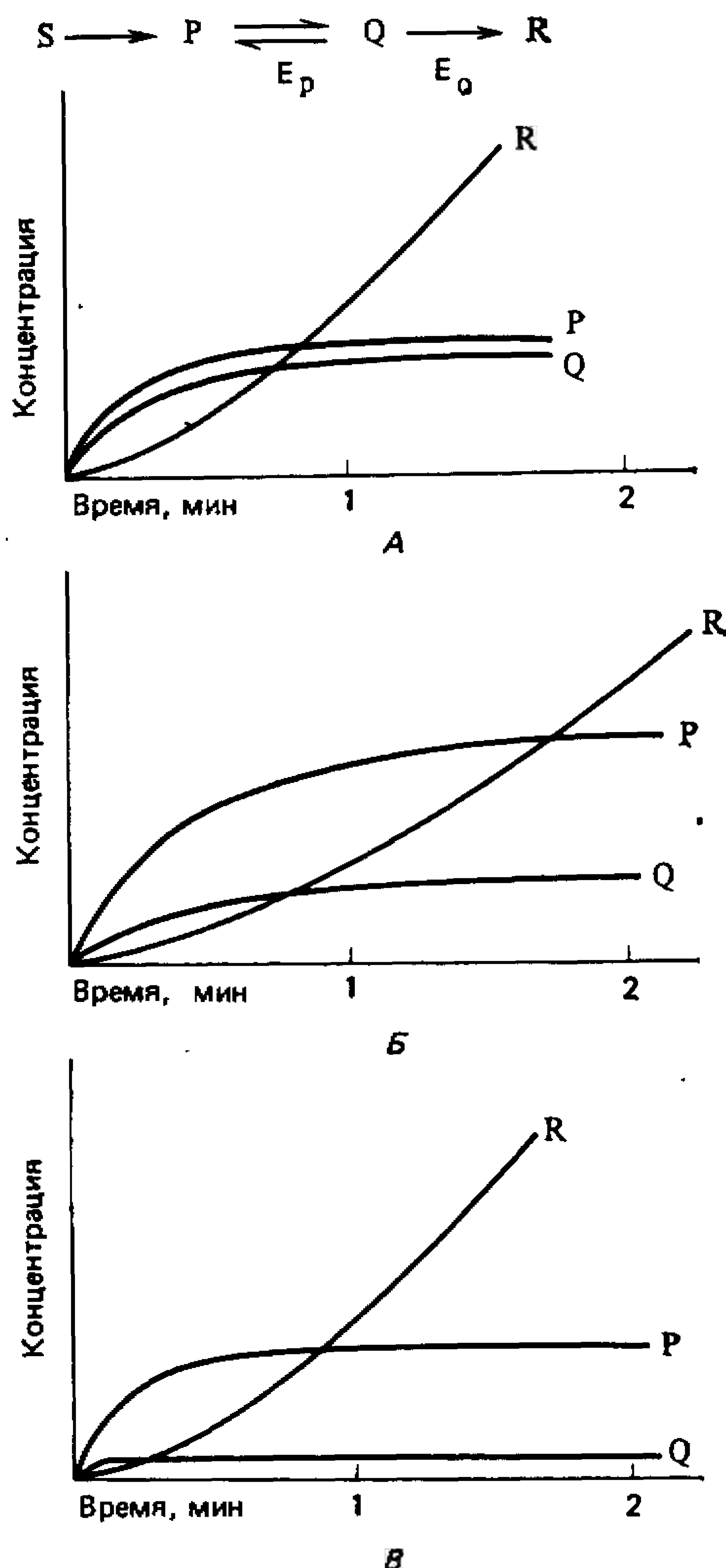


Рис. 8.11. Двустадийная сопряженная реакция, в ходе которой продукт P превращается в Q, а затем в R с помощью ферментов E_P и E_Q. *А*. Отложены концентрации P, Q и R; $V_{max}/K_M = 5$ мин$^{-1}$ для E_P и E_Q; $P \longrightarrow Q$ практически необратима. *Б*. $V_{max}/K_M = 5$ мин$^{-1}$ для E_P и E_Q; $P \longrightarrow Q$ обратима, и равновесие сдвинуто в сторону P. Обратите внимание, что скорость образования R все еще возрастает при 2 мин. *В*. То же, что и на рис. *Б*, но $V_{max}/K_M = 25$ мин$^{-1}$ для E_Q. Скорость образования R достигает стационарного состояния за 1 мин; значение $[Q]$ намного меньше, чем в случае *Б*.

Таким образом, количество фермента E_P, необходимое для того, чтобы скорость сопряженной реакции достигла за 1 мин 98% истинной скорости, можно найти из приведенного выше уравнения. Величина V_{max}, выраженная в мкмоль·мл$^{-1}$·мин$^{-1}$, — это число единиц фермента в одном миллилитре раствора, а K_M^P — константа Михаэлиса в отношении P. Следовательно, необходимое число единиц фермента решающим образом зависит от K_M^P : ед.·мл$^{-1}$ = 3,9·K_M^P. Так как были сделаны некоторые допущения (которые могут не оправдаться при очень малых ве-

личинах K_M^P), *минимальное* количество E_P можно определить как $5K_M^P$. Следует отметить, что, когда обсуждалось применение ферментов для измерения *количества* (а не скорости) образовавшегося продукта с помощью периодических методов (см. разд. 8.2), было указано, что количество сопрягающего фермента должно составлять около $1K_M^P$, чтобы реакция могла завершиться за 10 мин. Обе величины, V_{max} и K_M^P для сопрягающего фермента, относятся к условиям, существующим в буфере, в котором проводят тестирование (не обязательно в оптимальных условиях для сопрягающего фермента). Если сопрягающий фермент взаимодействует со вторым субстратом, концентрация которого не является насыщающей, необходима дополнительная коррекция «эффективного» значения V_{max}.

В условиях, когда используются два или более сопрягающих фермента, можно провести сходные расчеты. Количество каждого фермента, необходимое теоретически, немного больше, чем в том случае, когда используется один фермент ($V_{max}/K_M \sim$ ~ 10 мин$^{-1}$ для каждого фермента, но количество второго фермента зависит от того, в каком количестве присутствует первый, и наоборот). Вполне вероятно, что не все реакции в данной последовательности необратимы. Если это так, то потребуется больше того фермента, который функционирует на стадии, следующей за обратимой реакцией (рис. 8.11). В этих условиях нет смысла вводить больше фермента E_P, катализирующего обратимую реакцию. Однако фермент E_Q вынужден будет работать при более низком уровне Q, и его придется брать больше.

Обычно применяемый способ определения киназной активности основан на измерении образования ADP с помощью пируваткиназы (E_P) и лактатдегидрогеназы (E_Q). Этот пример будет использован для вычисления количеств сопрягающих ферментов. Оба фермента катализируют практически необратимые реакции (ΔG^0 — большая отрицательная величина), поэтому достаточно, чтобы величины V_{max}/K_M составляли около 5 мин$^{-1}$. Величина K_M для пируваткиназы в данном случае относится к ADP. В литературе существуют несколько противоречивые суждения о том, что служит истинным субстратом для этого фермента — ADP^{3-} или $MgADP^-$; количество каждой из этих двух форм должно зависеть от присутствия свободных ионов магния, которые так или иначе необходимы для реакции. K_M, равная 0,2 мМ, — это вполне разумная величина. Фосфоенолпируват, другой субстрат этого фермента, обычно используется в концентрации 0,2—0,5 мМ, что близко к насыщению. Существенную роль в реакции играют также ионы калия, и они должны присутствовать в концентрации 0,1—0,15 М, чтобы реакция протекала в оптимальном режиме. Если при такой высокой концентрации ионов K^+ соответствующую киназу нельзя тестировать, то необходимо ввести соответствующую поправку в величину V_{max} для пируваткиназы. Количество фермента должно быть равно по крайней мере 1 ед.·мл$^{-1}$ ($5 K_M^{ADP}$). Содержание фермента, указанное на коммерческих препаратах пируваткиназы, несомненно, относится к оптимальным условиям, поэтому целесообразно увеличить количество фермента в пробе до 2 (оптимум) ед.·мл$^{-1}$. Если измерение проводится при pH 8, когда пируват-

киназа имеет относительно низкую активность, следует использовать по меньшей мере в 5 раз больше фермента, чем требуется исходя из теоретических расчетов, т. е. 5 ед.·мл$^{-1}$.

Количество необходимой лактатдегидрогеназы зависит от ее происхождения. Наблюдаемая величина $K_М$ относится к пирувату; ферменты из скелетных мышц имеют более высокое значение $K_М$, чем ферменты из сердечной мышцы. С другой стороны, удельная активность ферментов из скелетных мышц также несколько выше. Если $K_М$ для пирувата равна 0,5 мМ, то минимальное количество лактатдегидрогеназы будет составлять 2,5 ед.·мл$^{-1}$. Однако фермент может быть не полностью насыщен своим вторым субстратом — NADH, и потому количество лактатдегидрогеназы следует увеличивать до 5 ед.·мл$^{-1}$. Таким образом, лактатдегидрогеназы может потребоваться больше, чем пируваткиназы, и не потому, что она — второй фермент, а из-за ее меньшего сродства к своему субстрату.

Можно вычислить истинные концентрации промежуточных продуктов ADP и пирувата. Если принять, что $V_{max}/K_М=5$, то скорость $v=0,03$ ед. и в стационарном состоянии $[ADP]=K_М^{ADP}\times 0,03/5=$ $=0,0012$ мМ, а $[Pyr]=K_М^{Pyr}\times 0,03/5=0,003$ мМ. В обоих случаях эти величины удовлетворяют исходному условию: [субстрат]$\ll K_М$, и поэтому упрощенное уравнение

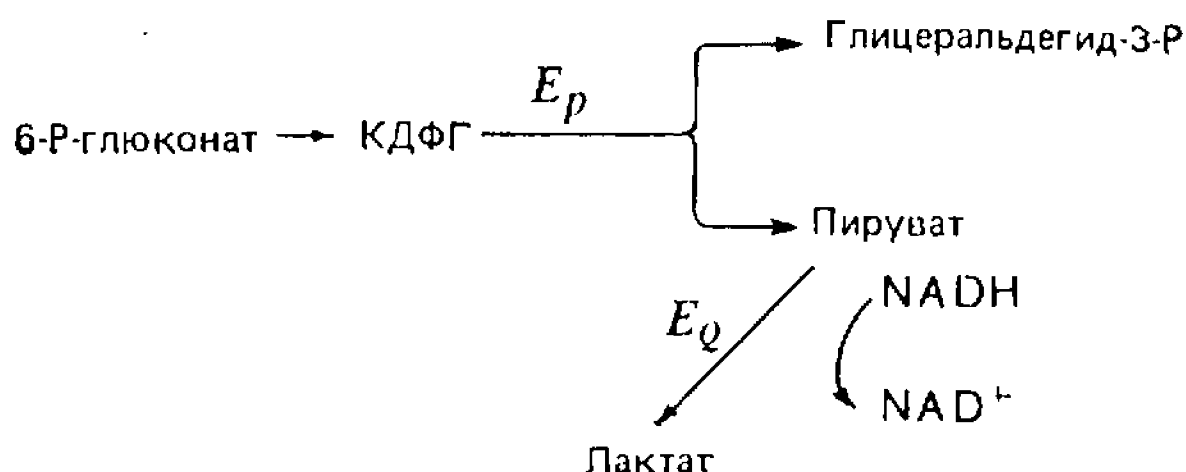
$$v=\frac{V_{max}\cdot[S]}{K_М}$$

здесь выполняется.

Если требуется, чтобы сопрягающая система достигла 98% истинной скорости в более короткое время, то необходимо увеличить количество сопрягающего фермента на соответствующую величину. Например, если время должно составлять 10 с вместо 1 мин, надо умножить указанные выше концентрации фермента на 6. Более подробный анализ сопряженных методов определения ферментов дан в работе [169].

Выполнив эти расчеты и оценив число необходимых тестов, следует поставить вопрос — имеется ли в наличии или можно ли приобрести достаточное количество сопрягающих ферментов? В случае, рассмотренном выше, когда в пробе объемом 1 мл должно содержаться 2 ед.·мл$^{-1}$ пируваткиназы и 5 ед.·мл$^{-1}$ лактатдегидрогеназы, расходы на приобретение ферментов будут незначительными. С другой стороны, ферменты, обладающие низкой удельной активностью, сто́ят намного дороже в расчете на одну единицу активности, а если к тому же они имеют высокие значения $K_М$, потребуется еще большее число единиц фермента. Таким образом, некоторые превосходные методы обходятся настолько дорого, что использовать их в текущей работе оказывается невозможно. Другая сторона того же вопроса — это доступность ферментов (что необходимо выяснить в самом начале), связанная не столько с их ценой, сколько с тем, имеются ли вообще в продаже такие препараты, а если нет, то можно ли получить их в лаборатории. Возьмем для примера ферменты метаболического пути Энтнера — Дудорова. Чтобы тестировать фермент 6-фосфоглюконатдегидрогеназу, необходим следующий фермент этого метаболического пути —

3-кето-2-дезокси-6-фосфоглюконатальдолаза (КДФГ-альдолаза). Этот фермент не выпускается промышленностью, и его необходимо очищать. Чтобы тестировать его, в свою очередь необходим субстрат. Его тоже нет в продаже, но это уже другая история. При наличии же запасов альдолазы можно легко измерить дегидрогеназную активность:



где E_P — КДФ-альдолаза и E_Q — лактатдегидрогеназа.

Еще один вопрос касается примесей. Если сопрягающий фермент содержит любой из определяемых ферментов, даже в контрольных пробах будет идти реакция с той или иной скоростью. Если эта скорость невелика, можно просто ввести соответствующую поправку (рис. 8.12). Примеси такого типа очевидны, и их влияние легко учитывается, хотя они могут снижать чувствительность определения. С другими примесями положение не столь ясно, и их влияние иногда обнаруживается слишком поздно.

При тестировании сырых экстрактов обычно возникают проблемы, связанные с присутствием кроме определяемого еще целого ряда других ферментов, которые могут искажать результаты. Эти проблемы распадаются на две категории: 1) сырой экстракт содержит достаточное количество других субстратов

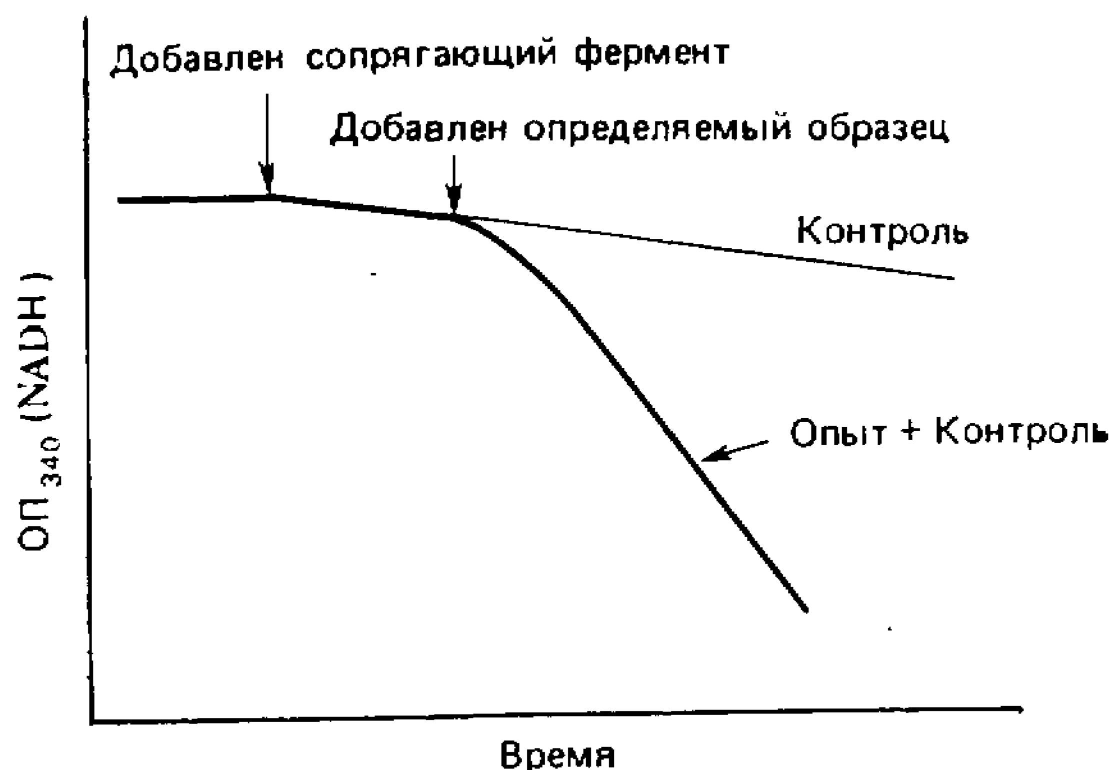


Рис. 8.12. Ход сопряженной реакции, сопровождающейся окислением NADH. В контрольном опыте также наблюдается эта реакция, протекающая с небольшой скоростью вследствие того, что в сопрягающих ферментах присутствует примесь определяемого фермента.

(а также ферментов), чтобы все обнаружимые реакции могли осуществляться; 2) на используемую сопрягающую систему могут влиять другие ферменты. Трудности в основном возникают, когда определяемый фермент имеет относительно низкую активность, поскольку в этом случае необходимо использовать большие количества образца, что увеличивает вероятность ощутимых помех. Например, если измеряется активность киназы по образованию ADP с помощью пируваткиназы и лактатдегидрогеназы, как описано выше, добавление достаточного количества глюкозы в образец (обычно в экстракты печени) будет активировать гексокиназу, а не только тестируемую киназу. Окисление NADH может происходить благодаря присутствию «NADH-оксидазной системы». Образование NADPH снижается из-за наличия в пробе глутатионредуктазы и окисленного глутатиона. Существует много таких возможностей, и если возникло подозрение, что имеют место какие-то помехи, то лучший способ выяснить, что же происходит на самом деле, — это спросить себя: «За чем я наблюдаю?» Обычно на этот вопрос

Таблица 8.3. Сравнение достоинств и **недостатков периодических и непрерывных методов тестирования ферментативной активности**

Периодические методы	Непрерывные методы
Нет ограничений в условиях	Условия ограничены требованиями, предъявляемыми сопрягающей системой
Использование очень малых объемов позволяет экономно расходовать дорогие реактивы	Обычно требуются большие количества реактивов, однако использование микрокювет позволяет сократить их расходование.
Высокая чувствительность радиохимических методов	Чувствительность обычно меньше, чем в случае радиохимических методов
Определение в одной точке может маскировать непостоянный уровень активности	Непрерывное наблюдение позволяет выявить нелинейность
Результаты получают не сразу	Результаты получают сразу
Необходимо проводить сложные манипуляции, занимающие много времени	Простые манипуляции
Не требуется сопрягающих ферментов при определении (но они могут понадобиться для измерения количества продукта)	Необходимы сопрягающие ферменты, они могут дорого стоить и (или) содержать примеси
Накопление продукта может приводить к ингибированию[1] реакции	Продукт удаляется с помощью сопрягающей системы

[1]) Для удаления продуктов можно ввести сопрягающую систему, которая не мешает наблюдениям.

отвечают: «За изменением поглощения при 340 нм». Далее можно задать следующие вопросы: «Происходит ли это изменение вследствие изменения мутности раствора или благодаря изменению концентрации NADH?, «Что еще может приводить к снижению или повышению концентрации NADH?» и т. д. Такие проблемы, как превращение субстрата под действием другого фермента или расходование продукта вследствие побочных реакций, могут быть разрешены с помощью различных контрольных определений, а иногда ингибиторов. Это обсуждается более подробно в работе [167].

Изложив принципы периодических и непрерывных способов определения ферментов, можно сравнить их относительные преимущества и недостатки. Это уже частично было сделано выше; в табл. 8.3 дано систематическое их сопоставление. В заключение необходимо упомянуть о так называемом «непрерывно-периодическом» методе. Используя автоматическую систему тестирования ферментов, можно отбирать пробы из реакционной смеси и после остановки в них реакции измерять количество продуктов реакции, получая таким образом непрерывный ряд значений ферментативной активности. Пример, приведенный на рис. 8.13, показывает, каким образом этот метод применяется для тестирования фосфатобразующих ферментов. Таким же способом можно проводить множество других определений, которые раньше выполнялись только с помощью периодических методов.

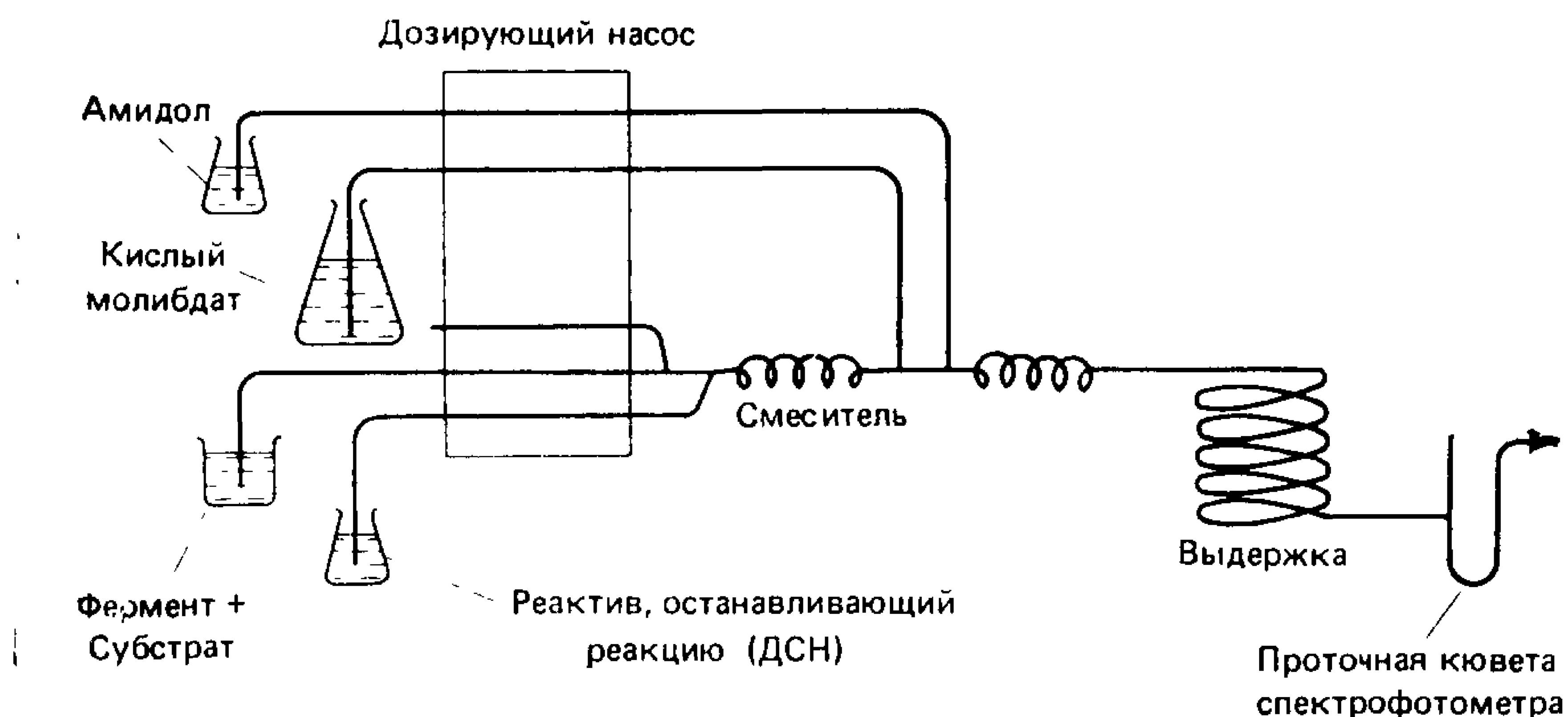


Рис. 8.13. Схема «непрерывно-периодического» определения ферментативной активности путем измерения продукта реакции — фосфата. Из реакционной смеси непрерывно отбираются пробы, к иим добавляется реактив на фосфат, и регистрируется образование фосфата.

8.4. ПРАКТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ

Выше были кратко описаны теория и основные принципы измерения ферментативной активности, причем были даны многочисленные рекомендации относительно того, чтó следует и чего не следует делать. Этот короткий раздел касается практических аспектов проведения измерений в лаборатории.

За обычный рабочий день, когда идет очистка фермента, иногда проводят лишь одно или два, но чаще десять или двадцать измерений активности, а во время элюции их может понадобиться еще больше. Многие смеси для тестирования ферментов содержат целый ряд компонентов — буферы, соли, субстраты, кофакторы и т. д.; поэтому приготовление отдельно каждой смеси не только неудобно, но и плохо в том отношении, что вследствие небольших изменений и ошибок в процессе приготовления состав смеси каждый раз будет меняться. Лучше всего подсчитать, сколько смеси расходуется за день, и приготовить весь необходимый объем сразу, исключив из него субстрат, который добавляют в последний момент при каждом определении. Некоторые реактивы, например простые буферные и солевые растворы, можно смешивать и хранить (охлажденными) в течение нескольких недель. Таким образом можно приготовить «реактив А», включающий все компоненты буфера, соли и, возможно, кофакторы; чтобы получить полную смесь, в него нужно добавить лишь один или два компонента. Многие биохимические реактивы весьма устойчивы в незамороженных растворах, при условии что исключено бактериальное или грибковое заражение. Для этого обычно достаточно добавить одну каплю 20%-ного раствора азида натрия на каждые 20 мл раствора. Многие исходные концентрированные растворы можно хранить при этом в течение нескольких месяцев в холодильнике. Другие реактивы могут быть химически неустойчивыми, и поэтому их надо приготавливать каждый день заново. Азид натрия редко влияет на ферменты, и, во всяком случае, он сильно разбавляется, если исходные растворы реактивов были концентрированными. В качестве примера приведем протокол смешивания реактивов для определения гексокиназы.

Чтобы приготовить 20 мл «реактива А» для определения гексокиназы,

возьмите 2 мл исходного буфера с рН 8,0 (см. ниже),

добавьте 1—2 капли 5%-ного раствора бычьего сывороточного альбумина,

0,4 мл исходного 10 мМ раствора $NADP^+$,

0,4 мл исходного 50 мМ раствора АТР,

10 мкл глюкозо-6-Р-дегидрогеназы
(суспензия в растворе сульфата аммония с активностью 1000 ед.·мл$^{-1}$).

Доведите объем раствора до 20 мл водой.

Исходный буфер содержит 0,3 *М* трис, 0,5 *М* KCl, 30 м*М* $MgSO_4$, 1 м*М* ЭДТА (+азид), рН доводят до 8 раствором HCl.

Методика определения:

Налейте 1 мл реактива А в кювету,

добавьте 20 мкл исходного 1 *М* раствора глюкозы («реактив В»),

измерьте A_{340} в контрольной пробе,

добавьте образец (0,2→10 мкл), измерьте увеличение A_{340}.

Гексокиназа
Глюкоза + ATP ⟶ Глюкозо-6-Р + ADP

Глюкозо-6-Р ⟶ 6-Р-глюконат (Глюкозо-6-Р-дегидрогеназа; $NADP^+$ → NADPH)

(Глюкозо 6-Р-дегидрогеназа из *Leuconostoc mesenteroides* может использовать NAD вместо NADP, что может быть экономически более выгодным.)

Если глюкоза содержится в «реактиве А», а АТР используется как «реактив В», то глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа медленно окисляет глюкозу и к концу дня поглощение раствора возрастает. Этого можно избежать, если АТР включить в «реактив А» и добавить туда глюкозу в последнюю минуту. Следует отметить, что если не используются очень лабильные соединения, то реактив А не следует хранить во льду; его температура должна быть близка к температуре, при которой проводится тестирование, чтобы на установление температурного равновесия в кювете уходило меньше времени. Это не относится к периодическим методам, так как в этом случае можно легко провести короткую предынкубацию. Контроль температуры в спектрофотометрах может быть осуществлен с помощью кюветодержателя с циркулирующей водой. Этот способ позволяет достаточно точно контролировать температуру, однако следует помнить две вещи. Во-первых, истинная температура в уравновешенной кювете может несколько отличаться от установленной в термостате температуры циркулирующей воды из-за потерь тепла на пути от термостата к кювете. Во-вторых, требуется около 10 мин, чтобы холодный раствор в кювете нагрелся до

температуры, отклоняющейся от равновесной не более чем на 0,5 °С. Это, конечно, создает определенные неудобства, и поэтому растворы лучше предварительно проинкубировать при нужной температуре. Из-за этих двух моментов обычно удобнее в текущей работе проводить измерения при комнатной температуре, регистрируя истинную температуру в кювете и вводя поправку на отклонение от стандартной температуры с помощью соответствующего коэффициента. При отклонении температуры в пределах 5 °С от стандартной (25 °С) поправка в 6% на градус является приемлемой средней величиной для многих ферментов (см. разд. 8.1). Не следует терять много времени на определение точного поправочного коэффициента для каждого фермента; достаточно протестировать один и тот же образец при нескольких температурах.

Заключительная стадия — это добавление фермента к смеси, содержащей все ингредиенты и выдержанной при подходящей температуре. Если препарат фермента обладает очень низкой активностью, то объем добавляемого образца может составлять 20% и больше от конечного объема смеси, тогда как концентрированные растворы высокоактивных ферментов приходится разбавлять в тестируемой смеси иногда в миллион раз. Шприцы на 1 мкл позволяют отмеривать пробы объемом всего лишь 0,5 мкл с ошибкой в 1—2%, но при отмеривании меньших объемов ошибки измерения неизбежно получаются больше. Необходимо иметь под рукой набор шприцев общим объемом от 1 до 100 мкл, с тем чтобы нужный объем жидкости был отмерен с оптимальной точностью. Если нужно взять пробу объемом менее 0,5 мкл, в повседневной практике можно использовать самые маленькие шприцы объемом до 0,1 мкл или даже меньше, имея, однако, в виду, что точность будет низкой. Надежные измерения должны проводиться с использованием образцов, объем которых составляет не меньше половины объема, измеряемого с минимальной ошибкой. Это означает, что образец обычно необходимо разбавлять. Разбавление следует проводить с максимальной точностью, так как эта стадия представляет собой дополнительный источник ошибок. Один из способов разбавления состоит в том, что к 100 мкл образца добавляют 0,9, 1,9, 4,9 или 9,9 мл буфера, отмеренные калиброванной пипеткой; при этом получают разбавление соответственно в 10, 20, 50 или 100 раз. Важен состав буфера, используемого для разбавления. Концентрация белка в образце может быть уже весьма низкой, и, чтобы избежать инактивации или адсорбции белка, следует добавить инертный белок. Обычно используется бычий сывороточный альбумин, растворенный в буфере для разбавления в концентрации около 1%. Сам буфер должен быть оптимальным в отношении стабильности фермента.

Если условия, обеспечивающие стабильность фермента, не известны, следует сначала взять буфер с pH 7, например фосфатный, содержащий ионы магния (1—2 мМ) и небольшое количество ЭДТА (0,1 мМ). Буфер для разбавления фермента можно хранить месяцами, если добавить в него 5 мМ азида натрия.

8.5. МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

Все ферменты представляют собой белки, поэтому полезно знать общее количество присутствующего белка на каждой стадии фракционирования. Еще важнее — следить за активностью фермента; количество белка можно измерить и позже, если в этом возникнет необходимость. Точное определение количества белка нужно: 1) когда стадия фракционирования сильно зависит от концентрации белка; 2) когда необходимо убедиться в том, что данная стадия приводит к удалению значительного количества нежелательных белков; 3) при тестировании удельной активности на предпоследней или последней стадии; 4) чтобы проиллюстрировать в отчете ход очистки.

Иногда полезно приблизительно знать, как обстоит дело в отношении содержания белка, однако часто достаточную информацию можно получить исходя из своего предшествующего опыта — по количеству осадка, по высоте пиков и т. д. Нет никакой настоятельной необходимости точно знать содержание белка на всех стадиях.

Этот вводный параграф включен в данный раздел, чтобы показать, что очистку фермента можно проводить рутинным способом, совсем не измеряя содержание белка или измеряя его лишь в конечном препарате. Определение количества белка в ходе самого фракционирования нужно делать только в том случае, если знание концентрации белка имеет решающее значение для процесса очистки. Если же это не важно, то можно отобрать небольшие пробы и определить в них белок позже.

Теперь мы опишем несколько доступных методов определения белка. Некоторые из них, требующие специальной аппаратуры (определение азота по Кьельдалю, рефрактометрия), исключены из рассмотрения. К наиболее широко применяемым методам относятся: 1) биуретовая реакция с использованием щелочного раствора соли меди; 2) метод Лоури с применением реактива Лоури—Фолина—Чиокалто; 3) измерение оптической плотности в УФ-области спектра при 280 нм (полоса поглощения ароматических групп) или при 205—220 нм (полоса поглощения пептидных групп); 4) связывание красителей.

Каждый из этих методов имеет свои достоинства и недостатки, но важно отметить, что ни один метод, за исключением взвешивания сухого белка, не дает однозначных и точных резуль-

татов в пределах нескольких процентов, если только он не калиброван по белковому раствору того же состава. Практически это означает, что истинно точное измерение можно провести лишь для чистых белков, после того как метод будет стандартизирован; для этого определяют сухой вес этих чистых белков и строят соответствующую калибровочную кривую. Однако если белок содержит небелковые простетические группы, углеводы или нуклеиновые кислоты, то определение сухого веса дает значение для всей молекулы, а не для ее белковой составляющей. Далее излагаются принципы четырех перечисленных выше методов.

Биуретовая реакция

В этой реакции используется сильнощелочной раствор солей меди, который дает пурпурную окраску с белками. Основная причина, по которой эта реакция широко не используется, — это ее низкая чувствительность. Для надежного определения нужно израсходовать несколько миллиграммов образца. Метод отличается точностью, так как выход по окраске мало меняется от белка к белку. Это связано с тем, что реактив взаимодействует с пептидной цепью, а не с боковыми группами. Аммиак мешает определению, так как образует комплекс с медью; поэтому в применении к фракциям, полученным путем осаждения сульфатом аммония, этот метод не дает точных результатов. Более высокая чувствительность биуретовой реакции может быть достигнута, если измерять концентрацию медьбелкового комплекса не при 540 нм, а при 310 нм, в ближней ультрафиолетовой области спектра [170]. К сожалению, при использовании этого метода необходимо ставить несколько контрольных проб, чтобы исключить поглощение посторонних веществ в этой области длин волн, из-за чего он и не нашел широкого применения.

Метод Лоури

Наиболее часто цитируемая работа в биохимической литературе — это работа Лоури, Розеброу, Фарра и Рэндалла [171], в которой был описан новый метод определения белков. Было обнаружено, что при сочетании биуретовой реакции и реакции с применением реактива Фолина—Чиокалто [172] белки, содержащие тирозин, дают интенсивную темно-синюю окраску. В оригинальной работе приведены концентрации реактивов для получения идеальных результатов. С тех пор появилось множество модификаций этого метода, в которых в основном сделаны попытки устранить влияние некоторых специфических веществ.

К сожалению, многие соединения, используемые при очистке ферментов, влияют на эту реакцию, поэтому необходимы различные модификации метода, чтобы преодолеть все препятствия. Вместе с тем метод отличается довольно высокой чувствительностью, так как дает хорошую окраску с белками, концентрация которых составляет 0,1 мг·мл$^{-1}$ и ниже; мешающие вещества чаще всего оказываются разбавленными до такого уровня, что их влияние становится незначительным. Подробный обзор метода и многих его модификаций опубликован в статье [173].

Поглощение в УФ-области спектра

Этот способ стал использоваться для определения количества белка с тех пор, как Варбург и Христиан [174] сообщили о методе, основанном на измерении оптической плотности при 260 и 280 нм, что позволяет ввести поправку на содержание в препаратах нуклеиновых кислот и нуклеотидов. Такая поправка очень важна, когда работают с сырыми экстрактами, но становится менее существенной по мере очистки белков и удаления мешающих веществ. В этом случае достаточно просто определить оптическую плотность при 280 нм. Белки поглощают при 280 нм единственно из-за присутствия в их молекулах остатков тирозина и триптофана (если только они не содержат поглощающих в УФ-свете простетических групп). Так как содержание этих двух аминокислот в белках очень сильно варьирует, коэффициент поглощения, выражаемый обычно как $E_{280}^{1\%}$ или $E_{280}^{1\,\text{мг/мл}}$, также варьирует в значительной степени. У большинства белков величина $E_{280}^{1\,\text{мг/мл}}$ лежит в интервале 0,4—1,5, но имеются белки, занимающие по этому показателю крайние положения в ряду всех известных белков — это некоторые парвальбумины и сходные с ними Ca^{2+}-связывающие белки (0,0), с одной стороны, и лизоцим (2,65) — с другой. Поглощение при 280 нм дает лишь приблизительное представление об истинном содержании белка; исключение составляют чистые белки. Если точно известен коэффициент экстинкции чистого белка (он должен быть стандартизирован относительно сухого веса или по крайней мере относительно поглощения при 205 нм — см. ниже), то величина поглощения при 280 нм позволяет точно определить его содержание. По существу, это самый точный метод для определения чистых белков, поскольку в этом случае не требуется производить с ним никаких манипуляций, за исключением соответствующего разбавления. Разумеется, растворитель не должен поглощать при 280 нм, а если он поглощает — необходим точный контрольный опыт. Во время измерений белки не подвергаются никаким вредным воздействиям и не разрушаются, поэтому, хотя для точного определения нужно около 1 мг бел-

ка, измеренную пробу можно вновь смешать с основным белковым раствором.

Измерение оптической плотности в далекой УФ-области спектра (вблизи полосы поглощения пептидных групп) используется как значительно более чувствительный метод, существенно менее зависимый от аминокислотного состава белков [175, 176]. Из-за поглощения кислорода в далекой ультрафиолетовой области с помощью обычных спектрофотометров нельзя измерить поглощение пептидных групп в максимуме при 192 нм. Однако измерения на краю полосы поглощения дают удовлетворительную точность, если величина оптической плотности составляет не менее 0,5. Коэффициенты экстинкции белков (1 мг в 1 мл раствора) примерно равны:

220 нм	11	205 нм	31
215 нм	15	200 нм	45
210 нм	20	Пик при ~192 нм	60
206 нм	29		

Значение коэффициента экстинкции при 206 нм включено в перечень, поскольку эта длина волны используется в приборах типа «Увикорд 3» фирмы LKB.

Приведенные выше значения варьируют от белка к белку вследствие того, что ароматические и другие остатки вносят разный вклад в поглощение в этой области и, кроме того, вторичная структура (α-спираль, β-конформация и т. д.) влияет на контур и точное положение максимума поглощения пептидных групп. Анализ возможных вариаций показал, что наиболее разумные значения получаются вблизи 205 нм [175]. Коэффициенты экстинкции почти для всех белков при этой длине волны укладываются в пределы 28,5—33. Введя поправку на содержание тирозина и триптофана (путем определения оптической плотности также и при 280 нм), коэффициент экстинкции при 205 нм можно определить с ошибкой не более 2% с помощью следующей формулы [177]:

$$E_{205}^{1\ \text{мг/мл}} = 27{,}0 + 120 \times \frac{A_{280}}{A_{205}}.$$

Так как величина 205 нм близка к предельным значениям длин волн, при которых еще можно проводить измерения на обычных спектрофотометрах, определение белка при этой длине волны требует использования очень чистых кювет, достаточно новой дейтериевой лампы и буферов с минимальным поглощением. Многие соли поглощают при этой длине волны. Среди обычных анионов исключение составляют сульфат и перхлорат. Можно использовать слабый фосфатный буфер (5 мМ, pH 7,0) в присутствии 50 мМ сульфата натрия (эта соль помогает из-

бежать адсорбции белка на стенках кюветы). Наиболее удобный спектрофотометр устанавливается на нуль с помощью буфера (3 мл), затем добавляют 1—10 мкл образца, содержащего от 2 до 50 мг/мл белка, и отмечают величину оптической плотности. Если известен состав буфера в образце белка, то такое же количество этого буфера следует добавить в контрольную кювету. Фактически все обычно используемые буферы сильно поглощают при 205 нм, но, в силу того что они разбавляются примерно в тысячу раз, их влияние на поглощение оказывается очень небольшим. Для разбавленных растворов белков поглощение буфера относительно выше и использование этого метода может быть практически нецелесообразным. Если достаточно менее точной оценки содержания белка (±10%), то можно использовать значение $E_{205}^{1\ \text{мг/мл}}=31$. При определении количества белка по отношению величин оптической плотности при 280 и 205 нм для измерения A_{280} следует использовать более концентрированные растворы белка и вводить соответствующий множитель в приведенное выше уравнение.

Таблица 8.4. Относительные достоинства и недостатки некоторых общеупотребительных методов определения количества белка

Метод	Необходимое количество белка, мг	Деструкция белков	Зависимость от аминокислотного состава	Примечания
Биуретовая реакция	0,5—5	Да	Низкая	Щелочной реактив; NH_4^+-ионы мешают определению; быстрое развитие окраски
Метод Лоури	0,05—0,5	Да	Умеренная	Медленное развитие окраски
Поглощение при 280 нм	0,05—2	Нет	Значительная	Поглощающие в УФ вещества мешают определению; ответ получают немедленно
Поглощение при 205 нм	0,01—0,05	Нет	Низкая	То же
Связывание красителя	0,01—0,05	Да	Умеренная	Кислый реактив; окрашенные вещества сорбируются на стекле; быстрое развитие окраски

Связывание красителей

Этот метод [178, 179] стал в последнее время очень распространенным, поскольку он отличается большей чувствительностью и не меньшей точностью, чем метод Лоури; кроме того, вся процедура не занимает много времени. Основная проблема чисто техническая: красители собираются на стенках стеклянной посуды и в кюветах (а также на коже!), что делает их довольно неприятными реактивами. При растворении кумасси синего G-250 в надхлорной кислоте он дает красно-коричневую окраску, но при связывании его с белком в том же растворе окраска становится синей. Метод заключается просто в добавлении образца белка к реактиву и измерении окраски при 595 нм. Рекомендуется использование одноразовых кювет, однако адсорбированный краситель можно быстро удалить, промыв кюветы разбавленным раствором додецилсульфата натрия. Образовавшаяся окраска в определенной степени зависит от состава белка, и поэтому для точного определения белков нужно построить калибровочную кривую, используя соответствующую смесь белков.

Этот краткий обзор некоторых из наиболее распространенных методов определения количества белка дает представление о существующих возможностях. Каждый метод имеет свои достоинства и недостатки, которые суммированы в табл. 8.4. Цель очистки ферментов состоит в том, чтобы удалить как можно больше белка, сохранив при этом ферментативную активность; успех каждой стадии зависит как от сохранения общей активности фермента, так и от степени повышения его удельной активности, выраженной в единицах активности на миллиграмм белка.

Подробные рецепты приготовления некоторых реактивов, используемых при определении белка, приведены в приложении Б.

ГЛАВА 9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧИСТОТЫ БЕЛКОВ; КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ

9.1. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Наиболее полное разделение смеси белков на индивидуальные компоненты достигается с помощью электрофоретических методов. Как уже обсуждалось в разд. 5.2, проведение *препаративного* электрофореза, несмотря на то что он обладает значительными теоретическими преимуществами, сопряжено с большими трудностями. Поэтому он используется не часто. В *аналитическом* же варианте электрофорез — это один из наиболее широко применяемых методов исследования. Действительно, чтобы охарактеризовать очищенные препараты белков, их теперь почти обязательно подвергают электрофоретическому анализу. Для проведения аналитического электрофореза в гелях требуется всего 5—25 мкг белка; это обычно не слишком значительная часть полученного препарата. До того как были предложены гелевые системы, электрофоретический анализ проводили в аппарате Тизелиуса методом движущейся границы. Хотя для этого приходилось расходовать десятки миллиграммов белка, разделения очень сходных белков не достигалось и анализ каждого образца требовал больших усилий и внимания. Затем был разработан аналитический электрофорез на бумаге и других целлюлозных материалах, используемых в качестве носителей, что исключило два из указанных выше недостатков метода Тизелиуса: количество необходимого для анализа белка значительно сократилось и проводить электрофорез стало намного легче, так как для этого метода требуется только простое оборудование. Однако разрешение осталось примерно таким же, как и прежде, даже при использовании обладающих хорошими качествами современных ацетатцеллюлозных пленок; это объясняется тем, что разделение компонентов смеси происходит в соответствии только с приблизительной величиной отношения заряд/размер и многие белки движутся вместе в виде одной зоны (ср. с разд. 5.2).

Когда Смитис [128] впервые применил в качестве поддерживающей среды крахмальный гель, степень разрешения сразу же повысилась. Из-за небольших размеров пор в этом геле (по сравнению с порами в бумаге, гелях агара и в других ранее

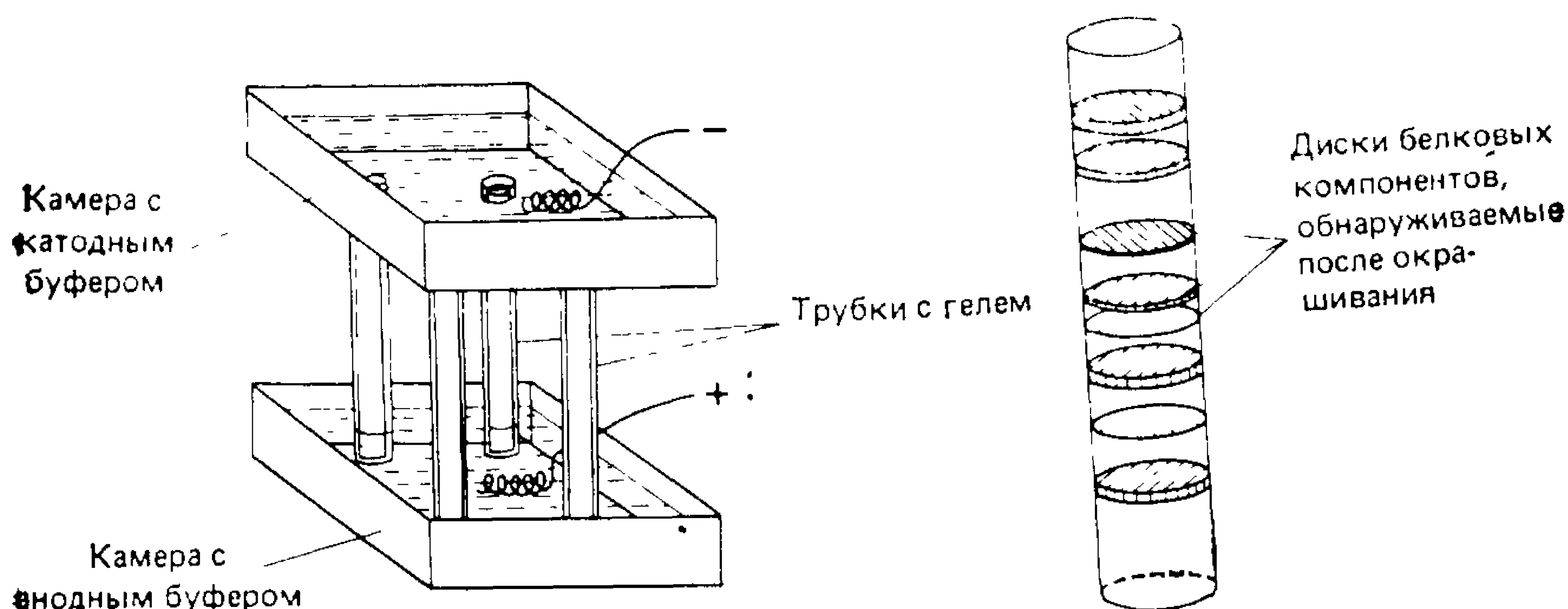


Рис. 9.1. Система диск-электрофореза в геле. Каждый белковый компонент отделяется в виде диска в трубке с полиакриламидным гелем.

использовавшихся материалах) перемещение крупных молекул сильно замедляется. Это результат кажущегося повышения вязкости среды: эффективная вязкость зависит от размеров молекул. Кроме того, благодаря снижению диффузии очень резкие зоны обнаруживаются даже после проведения электрофореза в течение ночи. Несколькими годами позже Орнстейн [129] предложил синтетическую гелевую среду — поперечно-сшитый полиакриламид. Применение этого материала дает возможность получать более контролируемые, чем у крахмального геля, размеры пор. Он обладает также и некоторыми другими достоинствами. Первоначально электрофорез в полиакриламидном геле назывался «диск-электрофорезом», потому что была распространена система, в которой образцы, помещенные в отдельные трубочки с гелем, разделялись на белковые зоны, имеющие форму дисков (рис. 9.1). Хотя этот вариант по-прежнему широко используется, он все более вытесняется электрофорезом на пластинах геля, который позволяет разделять одновременно несколько нанесенных рядом друг с другом образцов, что дает возможность непосредственно сравнивать подвижности компонентов разных образцов. В последние годы большое распространение получил тонкослойный гель-электрофорез на полиакриламидных пластинах. При этом были преодолены технические трудности, связанные с приготовлением однородных по толщине и больших по площади пластин геля, а также с необходимостью вносить в стартовые канавки геля большое количество образцов. В результате эта система стала такой же простой, как диск-электрофорез, но более производительной. Сейчас выпускается множество разновидностей приборов для тонкослойного гель-электрофореза, при этом толщина слоя геля может быть меньше 1 мм (рис. 9.2). Одно из преимуществ тонкослойного

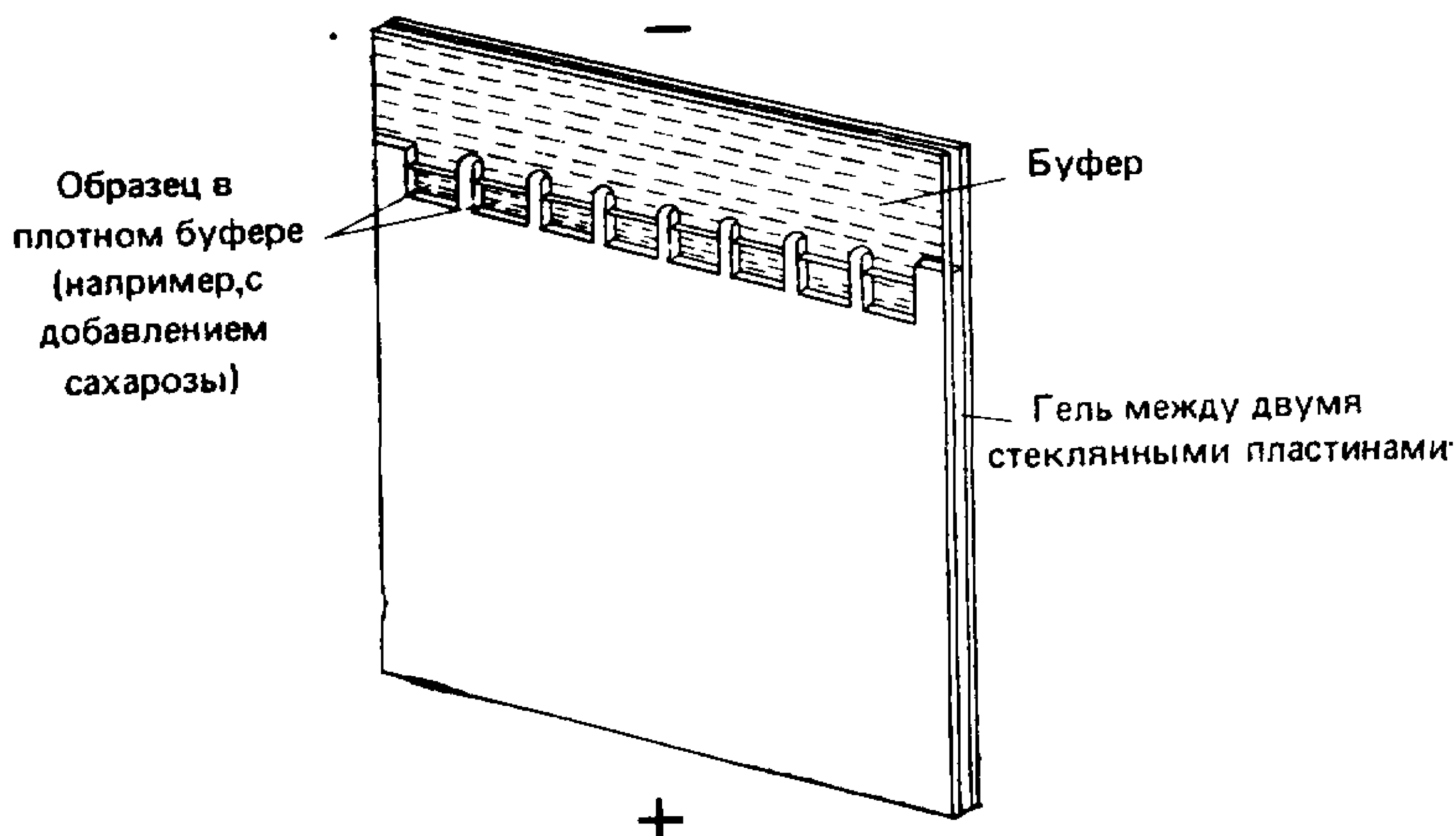


Рис. 9.2. Современный прибор для тонкослойного гель-электрофореза. Образцы вносят в канавки, сделанные в геле с помощью специальной «гребенки». Эта система позволяет сравнивать образцы, расположенные рядом друг с другом.

геля состоит в том, что он характеризуется более низким тепловыделением на 1 см^2 его поверхности при данном напряжении электрического поля. Кроме того, при окрашивании полос белка и удалении избытка несвязанного красителя последний гораздо быстрее диффундирует в тонкий слой геля и из него.

Существуют по крайней мере пять различных электрофоретических процедур, в которых полиакриламидный гель используется как среда.

Простой электрофорез

Он проводится в буфере с таким pH, при котором разделяемые белки сохраняют стабильность и нативную форму молекул. Этот метод был первым, в котором были использованы различия как в заряде белков, так и в их размерах. Хотя выбор буфера определяется природой белков, чаще всего используют слабощелочные буферные растворы с pH 8—9; в этих условиях большинство белков заряжено отрицательно и движется к аноду. Анод обычно расположен в нижней части геля. Следует отметить, что в этих системах не предусмотрено разделение белков, движущихся в противоположном направлении (рис. 9.1 и и 9.2), т. е. оснóвные белки в данном случае переходят в катодный буфер и утрачиваются для анализа. Поэтому если известно, что большинство исследуемых белков являются основными,

то необходимо, чтобы используемый буфер имел более низкое значение pH, а катод располагался в нижней части геля.

Концентрацию полиакриламида можно варьировать в широких пределах в зависимости от размеров фракционируемых молекул. Возможны два варианта: изменение общего содержания акриламида и изменение концентрации соединения, образующего поперечные сшивки (N,N′-метиленбисакриламида). Каждый из этих вариантов преследует приблизительно одну и ту же цель, так как при повышении концентрации одного из этих двух реагентов размеры пор уменьшаются, в результате чего перемещение более крупных молекул еще более замедляется. Для белков с очень большими размерами, вплоть до 10^6 дальтон, можно приготовить крупнопористый гель, содержащий 3—4% акриламида и 0,1% бисакриламида, хотя с ним довольно трудно работать. Для очень низкомолекулярных белков размерами около 10^4 дальтон можно применять гель, содержащий 15% акриламида и 1% (или меньше) бисакриламида. При высоком содержании соединения, образующего поперечные сшивки, гель становится мутным. Нормальным является соотношение, когда на 1 часть сшивающего агента берется 20—50 частей мономера (акриламида). Обычно используются гели, содержащие 7—10% акриламида. Полимеризацию инициируют, добавляя к раствору свежеприготовленный персульфат аммония (1,5—2 мМ) вместе с веществом, захватывающим свободные радикалы; для этого обычно используют ТЕМЭД (0,05—0,1% по объему, N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин). Вместо химической полимеризации можно провести фотополимеризацию с помощью рибофлавина. При этом получаются гели с меньшим количеством активных примесей. При комнатной температуре гель образуется примерно в течение 30 мин. Более подробные сведения о буферных растворах, устройстве аппарата для электрофореза и методах работы можно найти в инструкциях фирм-изготовителей.

Простой электрофорез можно также проводить в крахмальном геле. Крахмал по своим свойствам и поведению при гелеобразовании отличается меньшим постоянством по сравнению с акриламидом. Однако до того, как полиакриламидные системы получили широкое распространение, крахмальный гель был очень популярен. Его и теперь охотно применяют для определения ферментативной активности после электрофореза; пластину крахмального геля легко разрезать пополам по толщине: одну половину окрасить на белки, а другую использовать для определения ферментативной активности (см. рис. 9.6). Из-за того что крахмальные гели мутные, зоны окрашенных белков видны лишь на поверхности, поэтому для надежного детектирования количество разделяемых белков должно быть больше,

чем при использовании прозрачных гелей, в которых хорошо видны зоны окрашенных белков по всей глубине геля.

Простой электрофорез в агарозных гелях обладает меньшей разрешающей способностью, чем электрофорез в мелкопористых гелях, поэтому он менее пригоден для определения чистоты образца на основе его гомогенности.

Гель-электрофорез в присутствии мочевины

Этот метод особенно полезен для белков, нерастворимых при низкой ионной силе, используемой при электрофорезе. Он заключается в том, что белки в денатурированном состоянии подвергают электрофорезу в присутствии 6—8 М мочевины. Вначале образец растворяют в мочевине, чтобы полностью денатурировать все его компоненты. Обычно при этом добавляют немного меркаптоэтанола, который предотвращает образование дисульфидных связей между полипептидными цепями. В этих условиях белки разделяют в соответствии с величиной их зарядов и размерами субъединиц. Для этого вида электрофореза характерны те же ограничения, что и для электрофореза в отсутствие мочевины.

Крахмальные гели, содержащие мочевину, тоже дают удовлетворительные результаты при электрофорезе, и с ними легче работать, чем с полиакриламидными гелями. Хотя крахмальные гели в присутствии мочевины прозрачны, они становятся мутными после удаления мочевины во время их окрашивания и отмывания. Поэтому окрашенные зоны белков видны только на поверхности гелей.

Гель-электрофорез в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)

Этот, третий по счету метод электрофореза также можно использовать для разделения белков, нерастворимых при низкой ионной силе; в настоящее время он очень широко применяется для всех типов белков. В этом методе белки денатурируют анионным детергентом — додецилсульфатом натрия (рис. 9.3). Часто этот метод сокращенно обозначают как ПАГЭ-ДСН (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия). ПАГЭ-ДСН, обладающий высокой разрешающей способностью, покорил химиков, работающих с белками. Причина кроется в том, что разделившиеся зоны белков не только можно охарактеризовать по их относительной подвижности, но и определить размеры соответствующих молекул, поскольку при использовании этого метода полипептидные цепи делятся по размерам. Додецилсульфат натрия сильно связывается с бел-

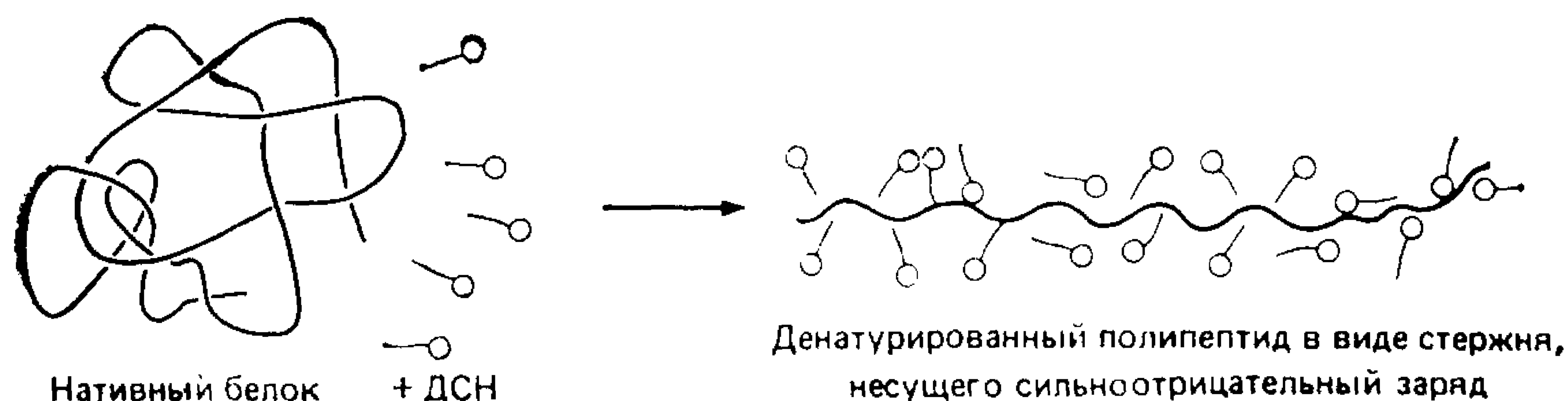


Рис. 9.3. Денатурация белков под действием додецилсульфата натрия.

ками [180], так что достаточно только 0,1%-ного раствора этого детергента, чтобы насытить им полипептидные цепи. При этом связывается приблизительно 1 молекула детергента на 2 аминокислотных остатка. Каждая молекула ДСН несет отрицательный заряд, поэтому типичный полипептид с мол. массой 40 000 приобретает около 180 отрицательных зарядов — это гораздо больше любого суммарного заряда, который может существовать (при нейтральном pH) на полипептидной цепи в исходном состоянии (без детергента). Следовательно, отношение заряд/размер в присутствии ДСН становится фактически одинаковым для всех белков, и их разделение происходит благодаря тому, что поры в геле действуют как молекулярное сито. И хотя в данной системе невозможно разделить белки одинаковых размеров, тем не менее этот метод дает наивысшее разрешение и самые четкие зоны по сравнению с любым другим методом. Более того, с помощью смеси стандартных полипептидов известной молекулярной массы гель можно прокалибровать в отношении зависимости подвижности молекул от их размеров. График такой зависимости обнаруживает линейность в широком интервале значений, если подвижность откладывают против логарифма молекулярной массы (рис. 9.4) [132].

При определении чистоты препарата фермента всегда надеются, что в образце содержится только один компонент; но если их оказывается несколько (и положение интересующего нас фермента может быть точно установлено), то начинается работа по идентификации возможной природы примесей. Не исключено, что при этом будут сделаны ошибочные выводы, но все же вполне вероятно, что примесь будет идентифицирована по ее молекулярной массе. Например, фосфоглицераткиназа, выделенная из листьев свеклы после очистки с помощью гель-фильтрации, по-прежнему содержала существеннное количество какой-то примеси [181]. Поскольку молекулярная масса мономера фосфоглицераткиназы равна приблизительно 45 000, а полоса примеси соответствовала мол. массе 26 000, было сделано за-



Рис. 9.4. Зависимость подвижности белков при гель-электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия от логарифма молекулярной массы для ряда очищенных белков.

ключение, что эта примесь является димером с мол. массой 52 000, который плохо отделяется при гель-фильтрации. Хорошо известный фермент метаболизма углеводов, триозофосфатизомераза (из дрожжей или мышц), представляет собой димер с мол. массой 2×26 500, и, действительно, результаты ферментативных тестов показали, что этот фермент присутствует в препарате фосфоглицераткиназы как примесь. Полное отделение фосфоглицераткиназы от примеси было достигнуто с помощью аффинной хроматографии на голубом сефадексе.

Очевидно, что примесь белка с абсолютно таким же размером субъединицы, как и у выделяемого фермента, не будет выявлена в данной системе; однако при оптимальных условиях возможно разрешение компонентов, различающихся по молекулярной массе всего лишь на 1%. Это не означает, что в действительности отношение подвижность/молекулярная масса находится точно в пределах 1%. Более строго следовало бы говорить о разрешении компонентов, у которых различия в подвижностях соответствуют разнице в 1% по молекулярной массе; на самом же деле их молекулярные массы могли бы быть идентичными. Надо заметить, что многие белки состоят более чем из одного типа субъединиц, так что множественность полос не обязательно свидетельствует о наличии в образце примеси. Если предполагается именно такая ситуация, то должно быть разумное соотношение между интенсивностями множественных компонентов. Например, белок с субъединичной структурой $\alpha_2\beta_2$, у которого α-субъединица имеет мол. массу 50 kD (килодальтон, или мол. масса$\times 10^{-3}$), а β-субъединица — мол. массу 30 kD, должен давать две полосы, причем интенсивность окраски в 30kD-полосе будет составлять только 60% интенсивности окраски в 50kD-полосе в соответствии с количеством содержащегося в них белка. Некоторые замечания по оценке относительных интенсивностей будут сделаны позднее.

Электрофорез в градиентных гелях

Это четвертый электрофоретический метод, который также широко используется в настоящее время. Он сходен с гель-электрофорезом в присутствии ДСН в том отношении, что белки в данном случае также разделяются только в соответствии с их размерами, а не по величине зарядов [182]. Концентрация акриламида изменяется по длине пластинки от самого высокого значения (обычно около 30%) в нижней ее части до всего лишь 3% в верхней. Буфер выбирается с высоким значением pH, так что в большинстве своем белки мигрируют в геле к аноду (вниз). Электрофорез длится до тех пор, пока каждый белок не достигнет такого участка в геле, где из-за слишком малых размеров пор он уже не сможет двигаться дальше. Например, небольшие белки могут дойти до участка, содержащего 25% акриламида, а крупные останутся вблизи старта (верхняя часть геля). Как и в системе с ДСН, при электрофорезе в градиентном геле можно определить размеры молекул, если прокалибровать гель с помощью смеси стандартных белков. Однако в данном случае эти размеры будут относиться к нативным белкам, а не к их субъединицам. Система электрофореза в градиентном геле сходна со следующим, пятым методом — изоэлектрическим фокусированием: процесс продолжается до тех пор, пока не прекратится перемещение всех белков и пока не завершится «фокусирование», или концентрирование, диффузных белковых зон, в результате чего будет достигнута очень высокая степень разрешения.

Изоэлектрическое фокусирование

Принципы изоэлектрического фокусирования были описаны в разд. 5.3. Распространенным методом с высокой разрешающей способностью является аналитическое изоэлектрическое фокусирование на пластинах полиакриламидного или агарозного геля. Компоненты смеси разделяются в соответствии с их изоэлектрическими точками, и полосы сужаются вследствие «фокусирующего» эффекта. Гель служит только стабилизирующей средой, которая не должна замедлять миграцию крупных белков. Поскольку необходимо, чтобы все молекулы в конце концов достигли положения, соответствующего их изоэлектрической точке, среда не должна оказывать сопротивления их движению из-за слишком большой вязкости. Из полиакриламидных гелей наиболее предпочтительны крупнопористые. Однако с ними трудно обращаться, а иногда вследствие неравномерной полимеризации получаются неоднородные гели. Если представляющие интерес белки имеют довольно небольшие размеры

(<100 kD), то лучше использовать 5—6%-ный полиакриламидный гель. В противном случае более подходящим материалом будет агароза, которая при концентрации всего лишь 2% (вес/объем) дает твердые крупнопористые гели.

В один гель можно внести несколько образцов, причем неважно, в каком месте они будут внесены, так как каждый компонент в итоге дойдет до соответствующего ему положения в градиенте pH. Концентрация амфолита обычно выбирается в диапазоне 2—4%. Фирмы производят уже готовые гели, содержащие амфолиты; после достижения равновесия получаются воспроизводимые результаты, соответствующие предсказанным градиентам pH. В процессе фокусирования проводимость амфолитов приближается к нулю, что дает возможность использовать высокие потенциалы (100—200 В/см) без слишком большого перегрева. Это способствует быстрому фокусированию, так что весь процесс может завершиться часа за два.

Одна из проблем изоэлектрического фокусирования состоит в том, что некоторые белки связываются с компонентами амфолитов, а это приводит к изменению изоэлектрической точки комплекса по сравнению с изоэлектрической точкой свободного белка. В результате могут появиться дополнительные слабые полосы, так как сами амфолиты тоже представляют собой дискретные компоненты. Таким образом, хотя наличие одной полосы при изоэлектрическом фокусировании служит хорошим критерием гомогенности, появление нескольких более слабых полос еще не свидетельствует об истинной гетерогенности белкового препарата.

Двумерные системы

Двумерный гель-электрофорез широко используется как аналитический метод. Он заключается в том, что полоску геля, содержащую белки, разделенные, например, с помощью изоэлектрического фокусирования, накладывают на кромку пластины другого геля, содержащего ДСН. Электрофорез проводится в направлении, перпендикулярном длинной оси полоски первого геля (рис. 9.5). Окончательные результаты разделения зависят от того, что в первом направлении белки разделяются в соответствии с их изоэлектрическими точками, а во втором — в соответствии с размерами субъединиц. Неочищенные клеточные экстракты в двумерных системах могут давать до 1000 индивидуально детектируемых белковых компонентов. Однако для анализа очищенного фермента необходимо проводить лишь одномерный электрофорез в каждой из двух систем (изоэлектри-

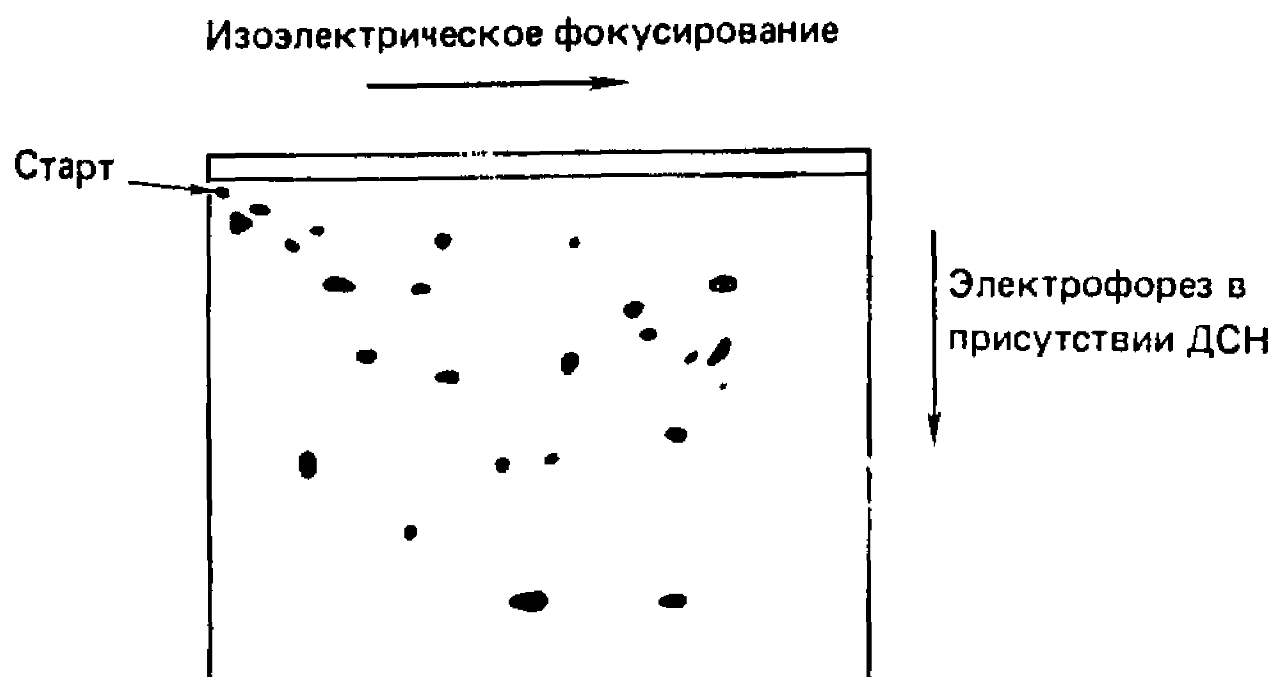


Рис. 9.5. Аналитический двумерный гель-электрофорез.

ческое фокусирование и ПАГЭ-ДСН). Таким образом, двумерный электрофорез не имеет значительных преимуществ при анализе очищенных препаратов.

Окрашивание белковых полос в геле и отмывка красителя

В этом разделе мы не намереваемся описывать все методические подробности, а хотим лишь обрисовать основные особенности используемых процедур. После проведения электрофореза зоны белков должны быть визуализированы. Этой цели служит процедура окрашивания, в которой обычно используется какой-нибудь органический краситель, прочно связывающийся с белками. Существует много пригодных для этого красителей. Они должны удовлетворять следующим требованиям: 1) обладать высокой чувствительностью, позволяющей определять малые количества белка и 2) интенсивность окраски должна быть пропорциональна количеству белка независимо от его типа. Большинство используемых красителей притягивается к положительно заряженным группам в молекулах белков (к остаткам лизина и аргинина); следовательно, белки с более высоким содержанием таких групп — обычно это более оснóвные белки — окрашиваются сильнее. В результате некоторые кислые полипептиды могут остаться незамеченными из-за слишком слабого связывания красителя.

Перед окрашиванием белки необходимо фиксировать на носителе путем их денатурации в кислой среде (если они еще не денатурированы). Для фиксации обычно используют либо смесь метанол/уксусная кислота/вода в соотношении 3 : 1 : 6, либо осадитель белка — трихлоруксусную кислоту, либо надхлорную кислоту в концентрации 5—10%. За исключением электрофоре-

за в присутствии ДСН и изоэлектрического фокусирования, во всех остальных случаях краситель может быть включен в смесь для фиксации. Если гели содержат ДСН, то последний следует сначала отмыть, иначе белки не будут связывать краситель. Амфолиты также связывают краситель, и поэтому им надо дать возможность выйти из геля в процессе фиксации и только потом приступать к окрашиванию.

Окрашивание производится с использованием красителя, растворенного в фиксаторе. Существует много различных методов для преодоления встречающихся здесь трудностей, связанных со скоростью окрашивания ([132, 183—189]; ссылками на эти работы отнюдь не исчерпывается вся литература по данному вопросу). В качестве красителей широко используются амидно-черный, нигрозин, кумасси синий G-250 и кумасси синий R-250. Последний особенно часто применяется для окрашивания белков, хотя он хуже окрашивает некоторые кислые белки по сравнению с амидно-черным. Кумасси синий обычно проявляет более высокую чувствительность, чем другие красители. В некоторых методах (см., например, [189]) красители не применяются, а используется свойство додецилсульфата калия или натрия выпадать в осадок на холоду. В белковых полосах содержится меньше свободного детергента, чем в промежуточных участках геля, поэтому полосы кажутся более прозрачными по сравнению с молочно-белым фоном. Этим методом можно быстро получить результаты после гель-электрофореза в присутствии ДСН, но он недостаточно чувствителен. Успешно использовалось также предварительное мечение белков флуорескамином [190]. В этом случае денатурированные белки можно наблюдать (в содержащем ДСН геле) в ходе электрофореза по их флуоресценции в ближней УФ-области спектра.

Отмывка несвязанного красителя из геля может занимать много времени. Процедура окрашивания должна быть достаточно длительной, чтобы краситель мог проникнуть в середину геля, после чего избыток красителя удаляют. Продолжительность окрашивания и отмывки красителя очень сильно зависит от толщины геля — поэтому в современных методах прослеживается тенденция использовать гели толщиной до 1 мм и меньше. Следует отметить, что в крахмальных гелях, которые после фиксации становятся непрозрачными, окраска белковых зон регистрируется только в очень тонком поверхностном слое геля, поэтому вся процедура окрашивания и отмывки излишка красителя занимает лишь несколько минут.

Недавно был предложен псевдофотографический метод окрашивания белковых зон серебром, который обладает большей чувствительностью, чем окрашивание кумасси синим. Он состоит в том, что после фиксации белки в геле обрабатываются

нитратом серебра, так что серебро связывается с белками (нестехиометрически); затем следуют этапы восстановления и усиления окраски; в результате весь процесс завершается за несколько часов [191]. Этот способ особенно полезен, когда для анализа доступны лишь очень малые количества образца. Вследствие того что процедура окрашивания происходит в более мягких условиях, наблюдается меньшая деформация геля, а следовательно, и полос белка.

Предельная чувствительность достигается введением радиоактивной метки в исследуемый образец. После фиксации (обычно путем замораживания геля) полосы белков, содержащие чрезвычайно малые их количества, можно детектировать с помощью методов радиоавтографии в любое удобное для исследователя время.

Специфическое окрашивание ферментов

Один из способов идентификации нужного фермента среди многих компонентов, разделившихся в процессе электрофореза, состоит в специфическом окрашивании этого фермента. Естественно, такой способ можно применять только в тех случаях, когда электрофорез проводят в неденатурирующих условиях и, следовательно, он не пригоден для выявления ферментов после электрофореза в присутствии мочевины или ДСН. Кроме того, процедуру идентификации фермента следует проводить без предварительной фиксации белковых полос, и тем не менее используемые реагенты должны успеть продиффундировать в гель прежде, чем произойдет диффузия самого фермента. Наиболее удовлетворительные результаты дают те методы, в которых гель разрезается по толщине на тонкие пластины (рис. 9.6), благодаря чему полосы белков оказываются на поверхности и необходимость в длительной диффузии реагентов в гель отпадает. Лучше всего для этого подходят крахмальные или полиакриламидные (толстые) пластины после проведения простого гель-электрофореза, электрофореза в градиентных гелях и изоэлектрического фокусирования.

Существует множество разновидностей этого метода, поэтому здесь будут кратко описаны только принципы, на которых основаны те или иные варианты. Гель можно обработать, погрузив его в раствор с реагентами, при условии что конечный продукт ферментативной реакции (краситель или осадок), который при этом выявляется, нерастворим и остается на месте своего образования. Если же окрашенный продукт, образовавшийся в том участке геля, где находится определяемый фермент, растворим, то он будет быстро диффундировать из геля в раствор с реагентами. Например, дегидрогеназы определяются по осаж-

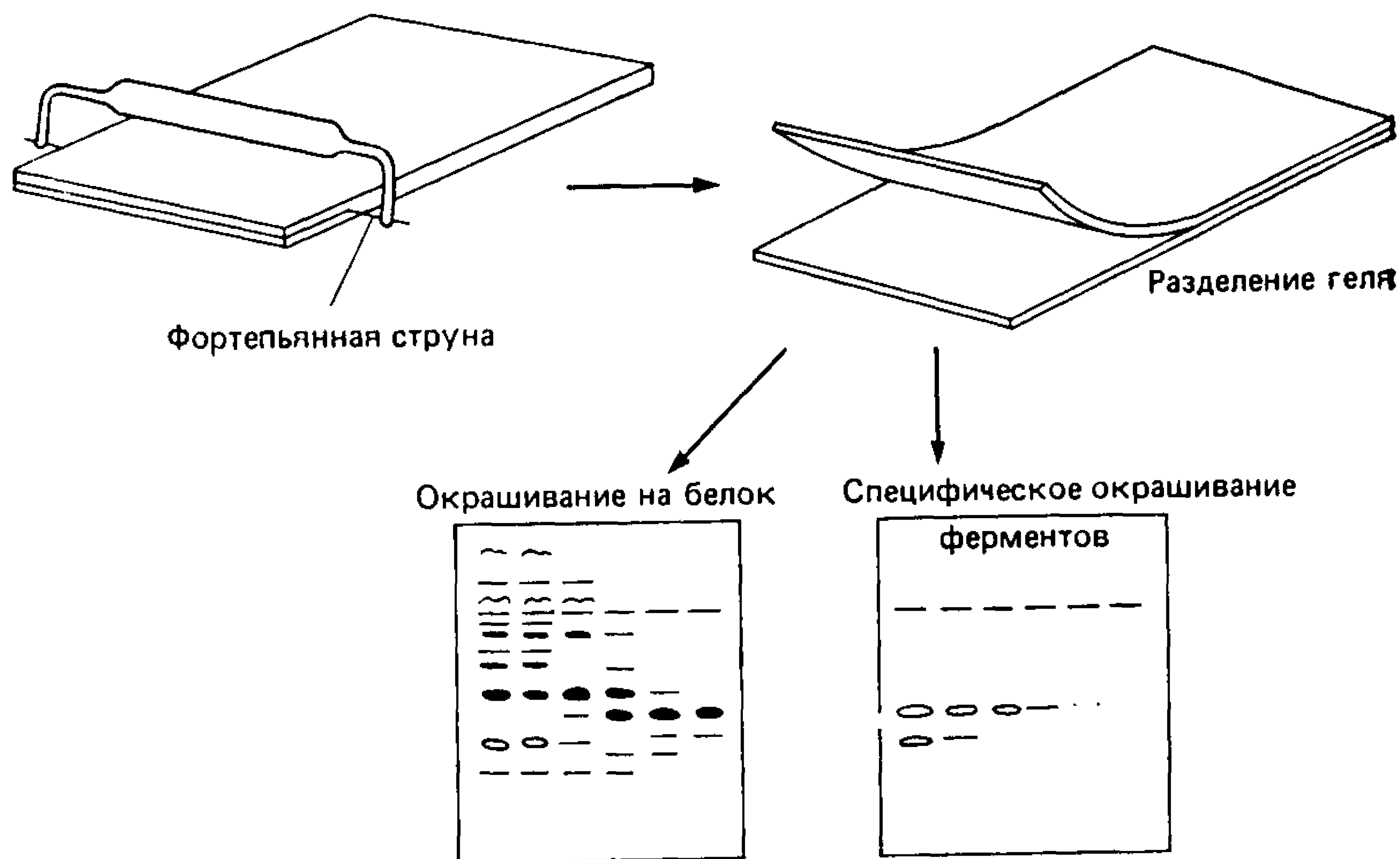


Рис. 9.6. Продольное разрезание пластины геля, позволяющее окрашивать белки в поверхностном слое геля.

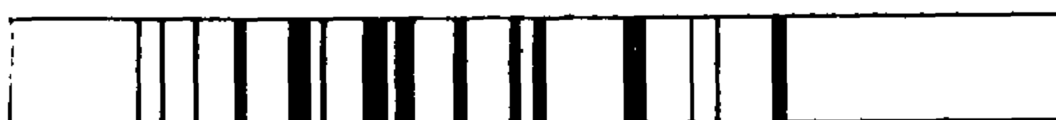
дению *нерастворимых* восстановленных тетразолиевых красителей, причем их восстановление происходит под действием NAD(P)H, образующегося в месте локализации дегидрогеназы.

Согласно другой процедуре, реагенты частично иммобилизуются; для этого их вносят в раствор, полимеризующийся затем с образованием геля (например, геля агара, который помещают на поверхность электрофоретического геля) или ими пропитывают фильтровальную бумагу. В этих случаях можно локализовать сложную цепь реакций, инициируемых определяемым ферментом, так как даже тогда, когда видимый продукт растворим, он не может быстро диффундировать наружу. Процессы, аналогичные тем, которые протекают при измерении ферментативной активности сопряженными методами (см. разд. 8.3), тоже можно использовать для локализации ферментов; так, образование или окисление NAD(P)H можно наблюдать в ближнем ультрафиолете (сине-зеленая флуоресценция). Для качественного обнаружения ферментов в геле часто применяют такие химические методы, которые обычно не используются для определения ферментативной активности в растворе. Например, освобождение фосфата под действием различных фосфатаз может быть замечено по появлению осадка фосфата кальция [192]. Если же этот осадок не очень отчетливо виден, то после отмывания избытка реагентов его можно превратить в фосфат свин-

ца, дающий черные полосы в местах, где расположен активный фермент.

Представляя для печати результаты, полученные при определении чистоты ферментного препарата с помощью гель-электрофореза, важно дать какую-то количественную оценку содержания всех присутствующих в нем примесей. Заявление, что образец «дал одну полосу при электрофорезе», неубедительно, если количество нанесенного на гель белка было настолько мало, что получилась только одна слабо окрашенная зона. Желательно также представить какое-то подтверждение того, что окрашенная полоса — это действительно данный фермент, а не присутствующий в препарате другой белок, который в количественном отношении даже превосходит исследуемый фермент. В литературе часто встречаются примеры того, как совершенно ошибочно основная полоса, полученная при электрофорезе, без всяких доказательств приписывается очищенному ферменту, хотя на самом деле она относится к примеси. Если удельная активность выделенного препарата слишком низка, то количество данного фермента в нем может составлять всего лишь 1% общего содержания белка, и при гель-электрофорезе его вряд ли можно заметить. В этом случае могут помочь фотографии электрофореграмм, хотя на них обычно плохо воспроизводится картина распределения окраски по относительной интенсивности. Более надежные в этом смысле результаты дает сканирование окрашенного геля (рис. 9.7). При этом единственная оговорка, которую можно сделать, касается относительной интенсивности *специфической* окраски различных обнаруженных компонентов. Исходя из предположения, что все белки окрашиваются одинаково, можно произвести точное количественное определение всех компонентов, используя гель-сканирующее устройство.

Итак, аналитический гель-электрофорез является одним из наиболее широко применяемых в биохимической лаборатории



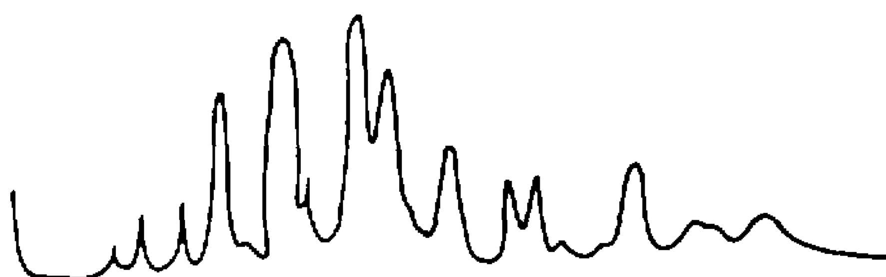


Рис. 9.7. Сканирование окрашенного геля для количественной характеристики белковых зон. Можно также сканировать неокрашенный гель при 280 нм, что позволяет определять белки по их поглощению при этой длине волны.

методов (для исследования не только белков, но и нуклеиновых кислот). Характеристика очищенного белка одним из описанных здесь методов, по существу, является обязательной. Выпускаемые теперь усовершенствованные приборы для проведения электрофореза в тонком слое полиакриламидного геля позволяют даже малоопытному исследователю легко и быстро получать высокое разрешение. Безусловно, кроме тех методов, которые были описаны в данном разделе, существуют также принципиально другие методы, пригодные для тех же целей; анализ ферментных препаратов на основе двух различных принципов дает гораздо больше информации о предполагаемой чистоте и других характеристиках этих препаратов.

9.2. ДРУГИЕ АНАЛИТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Эти методы по сравнению с универсальными и играющими очень важную роль в биохимической практике методами аналитического гель-электрофореза имеют ограниченное применение, поэтому их описание будет кратким. Цель анализа конечного продукта, полученного в результате очистки, заключается в том, чтобы выяснить, содержит ли он один или большее число белков, и обнаружить в нем примеси, даже если они присутствуют в очень малых количествах. Гель-электрофорез позволяет выявить примесь какого-то одного компонента, составляющую 1% содержания основного компонента при условии их хорошего разделения. Однако бывают случаи, когда электрофорез не пригоден для исследования препарата. Это особенно относится к липопротеинам и другим связанным с мембранами белкам, которые при электрофорезе ведут себя необычно и нуждаются в определенных детергентах для поддержания их структурной целостности. В этих случаях, может быть, лучше использовать ультрацентрифугирование как основной или по крайней мере дополнительный метод, позволяющий получить информацию о гетерогенности данного препарата. В опытах по скоростной седиментации хорошо разделяются компоненты с сильно различающимися коэффициентами седиментации, однако если примесь по этому параметру сходна с основным компонентом и особенно если ее относительное количество слишком мало, то этот метод не дает надежных сведений о гетерогенности препарата. Метод седиментационного равновесия более пригоден для детектирования небольших количеств примеси по отклонению экспериментальных данных от теоретической прямой зависимости между логарифмом концентрации и квадратом расстояния от седиментирующей частицы до оси вращения. Однако это от-

клонение можно интерпретировать и иным образом, например как свидетельство димеризации основного компонента.

По данным N-концевого анализа белков можно в какой-то степени судить о гомогенности препарата. При условии что N-концевая аминокислота не ацетилирована или не заблокирована каким-либо иным способом, идентификация N-концевой аминокислоты только одного типа без малейших следов других аминокислот служит хорошим указанием на присутствие в препарате одного-единственного белка. Однако такой вывод должен быть подкреплен данными о том, что в препарате нет примесных белков с блокированными N-концами или с N-концевой аминокислотой, идентичной N-концевой аминокислоте основного компонента.

Аминокислотный состав также может дать сведения о предполагаемой гетерогенности препарата, при условии, что точно определены количества двух или более аминокислот и известна молекулярная масса субъединиц фермента. Если молярное содержание этих аминокислот нельзя выразить простым отношением, связанным с размером данного полипептида, то, вероятно, это объясняется присутствием большого количества примеси. Например, если известно, что молекулярная масса полипептида близка к 30 000 дальтон, а количества триптофана и тирозина, определенные спектрофотометрически [193], равны соответственно 5,1 и 6,5 остатка на 30 000, то либо эти определения недостаточно корректны, либо в препарате присутствует примесь, отличающаяся от основного компонента соотношением триптофана и тирозина. По очевидным причинам такие аргументы могут быть убедительными только в случае небольших по размерам полипептидов, причем отношение между количествами каких-либо двух аминокислот, равное целому числу, не служит доказательством гомогенности препарата. Эти расчеты становятся более ценными, когда имеются данные о гомогенности препарата, полученные другими методами, но точная молекулярная масса белка не известна. Тогда точное молярное отношение двух или более аминокислот дает возможность рассчитать молекулярную массу с некоторой достоверностью.

Использование кристаллизации как критерия гомогенности будет рассмотрено в следующем разделе; но и этот критерий не является однозначным.

В заключение этого короткого раздела следует сказать, что неэлектрофоретические методы не дают четких результатов и к тому же некоторые из них очень трудоемки. Тем не менее они могут использоваться для частичного изучения фермента в качестве дополнительных методов.

9.3. КРИСТАЛЛИЗАЦИЯ ФЕРМЕНТОВ

Вполне уместно завершить эту книгу разделом о кристаллизации ферментов, поскольку получение кристаллов часто представляет собой конечную стадию очистки и изучения фермента. Часть этого раздела следовало бы поместить в гл. 3, потому что кристаллизация как метод осаждения — это очень хороший и часто используемый способ очистки ферментов. Но все же более уместно обсудить его в общих чертах в этом разделе. Кристаллизация играет важную роль в научных исследованиях по меньшей мере четырех типов; она используется: 1) как метод очистки ферментов, 2) для подтверждения гомогенности ферментных препаратов, 3) как метод стабилизации ферментов при хранении и 4) для определения третичной структуры ферментов методом рентгеноструктурного анализа.

Способ получения кристаллов одинаков для всех областей использования кристаллизации (за исключением, может быть, п. 4 — см. далее), поэтому все они могут быть обсуждены вместе. Кристаллы образуются из пересыщенных растворов вследствие агрегации молекул высокоупорядоченным образом, а не в результате беспорядочной агрегации, которая приводит к образованию аморфных осадков. Кристаллы в большинстве случаев представляют собой термодинамически более предпочтительное состояние, чем аморфные осадки (в противном случае они не могли бы образоваться); тем не менее при поверхностном взгляде это кажется неожиданным, так как кристаллизация явно сопровождается возрастанием упорядоченности в пространственном расположении белковых молекул, а следовательно, и уменьшением энтропии белка. Однако термодинамика *целой системы* гораздо сложнее. Разупорядочение ранее связанных молекул растворителя во много раз превышает фактор упорядочения молекул белка. Простые органические вещества могут кристаллизоваться из подходящих растворителей, и кристаллы за несколько секунд вырастают в размерах до нескольких миллиметров. Но кристаллы белков растут не так быстро, потому что диффузия, столкновения и повороты больших молекул происходят гораздо медленнее. Чтобы взаимодействовать друг с другом соответствующим образом и образовывать правильные кристаллы, молекулы должны сталкиваться только под определенным углом. Но, прежде чем произойдет правильное соударение молекул, может быть много «непродуктивных» столкновений. Поэтому белковые кристаллы приходится выращивать длительное время, особенно если необходимо получить более крупные кристаллы. Но иногда микрокристаллы образуются очень быстро. Об этом можно судить по появлению характерного двойного лучепреломления при встряхивании суспензии асим-

метричных частиц, размеры которых лишь немного превышают длину волны видимого света. Микрокристаллы имеют обычно удлиненную, иглоподобную форму; при перемешивании суспензии микрокристаллов наблюдаются очень красивые переливы.

Два кристаллографических признака, которые часто (но не всегда) связаны между собой, — это морфология самого кристалла и геометрическая природа молекулярной упаковки внутри кристалла. Последняя характеристика называется *пространственной группой,* которую не обязательно знать неспециалистам. Морфология, или форма, кристаллов — это то, что можно наблюдать непосредственно (при помощи микроскопа), и нередко для того или иного фермента характерна определенная форма кристаллов. Встречаются иглы с треугольным, квадратным или гексагональным сечением, ромбовидные или квадратные пластинки, глыбовидные кубы и усеченные октаэдры, гексагональные и другие бипирамиды. Некоторые ферменты в зависимости от условий выращивания образуют кристаллы различной формы. Обычно более крупные кристаллы должны выращиваться в таких условиях, которые не способствуют их быстрому росту; сосуды, в которые помещены кристаллы, должны быть очень чистыми, так как это в значительной мере исключает вероятность образования множественных центров кристаллизации; предпочтительно, чтобы кристаллы выращивались в помещении, где отсутствует вибрация. Такие кристаллы нужны для рентгеноструктурного анализа, и их выращивание занимает недели и месяцы. Для других приложений быстрота роста кристаллов важнее их абсолютных размеров.

При очистке ферментов кристаллизация часто является конечным этапом; иногда это не приводит к какому-либо повышению удельной активности, так как препарат, возможно, уже достаточно «чист». Когда в таблице, отражающей ход очистки фермента, в качестве последнего этапа представлена кристаллизация, это указывает на то, что фермент получен в достаточно чистом состоянии; кроме того, это означает, что такой кристаллический препарат пригоден для хранения. Но кристаллы могут образовываться в очень разнородных смесях белков. Если нежелательные примеси не находятся в перенасыщенном состоянии, то агрегация будет затрагивать молекулы только того белка, который присутствует в перенасыщенном состоянии. А если она будет протекать достаточно медленно, то могут образоваться кристаллы этого белка. Например, первоначальный метод очистки кроличьей альдолазы [194] заключался в том, что к мышечному экстракту добавляли сульфат аммония до 50%-ного насыщения, а затем образовавшийся осадок удаляли. Можно подсчитать, что альдолаза составляла 15% белка, оставшегося в надосадочной жидкости. При увеличении кон-

центрации сульфата аммония до 52% насыщения альдолаза начинала медленно кристаллизоваться. Присутствие 85% других белков не мешало этой кристаллизации. Отсюда следует, что образование кристаллов фермента не может служить доказательством того, что раствор, из которого они выпадают, содержит чистый фермент. Однако мало вероятно, что в самих кристаллах содержится много примесей, если только не происходит одновременно кристаллизации или аморфной агрегации примеси в момент кристаллизации интересующего нас фермента. В последнем случае существенно то, что кристаллы фермента, даже если они и не загрязнены посторонними примесями, невозможно собрать отдельно от других выпавших в осадок белков.

Хотя кристаллизация как этап очистки может быть весьма полезной, выход фермента по активности будет недостаточно высоким, если кристаллизация не доведена до конца. При быстром образовании микрокристаллов результаты получаются не хуже, чем при медленном выращивании крупных кристаллов; быстрое проведение кристаллизации и перекристаллизации оказалось в ряде случаев весьма эффективным [35, 195]. При осуществлении последовательных этапов перекристаллизации необходимо достигнуть стационарного состояния, когда удельная активность перестает возрастать. Это также один из критериев гомогенности.

Еще одно важное достоинство кристаллизации это то, что она позволяет сохранять в течение длительного времени очищенные белки. Многие фирмы выпускают ферментные препараты в виде суспензии кристаллов не просто из желания продемонстрировать высокую степень их чистоты, а потому что такие суспензии — это самый надежный метод хранения ферментов (кроме, может быть, глубокого замораживания). Это объясняется рядом причин. Во-первых, молекулы в кристаллах плотно упакованы и потому оказываются иммобилизованными, так что вероятность тепловой денатурации снижается. Далее, трудно себе представить, что протеолитические ферменты, присутствующие в препарате, могут кристаллизоваться вместе с очищенным ферментом или белком (хотя протеазы могут вполне адсорбироваться на поверхности кристаллов). Поэтому в суспензии кристаллов большинство белковых молекул предохранено от протеолитической деградации. И наконец, кристаллизация обычно проводится в условиях высоких концентраций сульфата аммония, что предотвращает бактериальное загрязнение и стабилизирует белковые молекулы.

Методы кристаллизации

Чтобы началась кристаллизация белков, необходимо создать такие условия, в которых белковый раствор становится перенасыщенным, что приводит к белок-белковой агрегации. Для выращивания крупных кристаллов лучше всего использовать не слишком перенасыщенные растворы, в которых нет аморфных осадков. Однако при удалении белка из раствора по мере образования кристаллов раствор перестает быть перенасыщенным и рост кристаллов прекращается. Кристаллизация, используемая как метод очистки, приводит к большим потерям белка, который остается в надосадочной жидкости. Однако путем непрерывной регуляции соответствующих условий белковый раствор можно поддерживать в перенасыщенном состоянии до тех пор, пока почти весь белок не закристаллизуется. Чтобы достичь перенасыщенного состояния, можно использовать любой осадитель из перечисленных в гл. 3. Хотя чаще всего для этой цели применяют сульфат аммония, кристаллы, образующиеся в условиях «всаливания» (при низкой ионной силе), могут быть пригодны для рентгеноструктурного анализа; однако при этом необходимо побеспокоиться о поддержании белка в стабильном состоянии из-за возможного загрязнения препарата микроорганизмами. Иногда с успехом применяются органические растворители, но из-за длительности этой процедуры необходимо поддерживать низкие температуры.

В ряде случаев, когда сульфат аммония не способствовал росту крупных кристаллов, он был удачно заменен полиэтиленгликолем [196, 197]. Опубликовано несколько теоретических и практических работ по проблемам выращивания крупных кристаллов, пригодных для рентгеноструктурного анализа биополимеров [198—201].

Обычно требуется тщательное изучение условий кристаллизации конкретного белка, так как небольшие изменения pH, концентрации буфера или ионов металлов могут существенно ухудшать качество образующихся кристаллов. Один и тот же фермент, выделяемый из разных видов, может вести себя совершенно по-разному. Кристаллографы чаще всего используют ферменты из необычных источников именно потому, что фермент из какого-то одного вида кристаллизуется легче, чем ферменты из многих других видов. Отсюда: кашалот, омар, лошадь, кошка, курица и пр., а не крыса, кролик или *E. coli*.

Чтобы осуществить кристаллизацию с целью стабилизировать фермент для длительного его хранения, не требуется столь строго контролируемых условий. Для хранения пригодны микроскопически мелкие кристаллы. В самом деле, работать с

крупными кристаллами даже неудобно, когда из запаса фермента нужно взять какое-то определенное его количество. Наиболее пригодный способ кристаллизации ферментов, предназначенных для хранения, заключается в том, что к ферментному раствору добавляют сульфат аммония. При высокой концентрации соли фермент сначала полностью переходит из раствора в осадок, т. е. «высаливается». Суспензию снова растворяют в маленьком объеме соответствующего буфера, после чего добавляют по каплям насыщенный раствор сульфата аммония до тех пор, пока в растворе не будет обнаруживаться небольшая устойчивая мутность. Затем образец быстро центрифугируют, чтобы удалить любые следы пыли, волоски, денатурированный белок, и надосадочную жидкость помещают на холод. Если приблизительно через день кристаллы не образуются, а раствор становится более мутным, добавляют еще небольшое количество сульфата аммония.

Если кристаллизацию используют как способ *очистки,* то все описанные выше процедуры проделывают гораздо быстрее; некоторое избыточное количество сульфата аммония может быть сразу добавлено после центрифугирования, и как только появятся кристаллы (их идентифицируют по появлению муарового блеска при встряхивании), можно еще добавить сульфат аммония. Важно выделить как можно больше фермента, оставив в растворе только минимальное его количество, хотя всегда имеется опасность, что при дальнейшем добавлении сульфата аммония начнет выпадать какая-нибудь примесь. Вторая кристаллизация позволяет избавиться от следовых количеств примесей. Вследствие того что концентрация примесей с каждым циклом снижается, для их осаждения нужен все более высокий уровень содержания сульфата аммония, тогда как для кристаллизации очищаемого белка этого не требуется. Из-за стабилизирующего влияния сульфата аммония время, необходимое для проведения кристаллизации, не является критическим, лимитирующим, фактором (ср. разд. 7.1). Однако если кристаллизация проводится при низкой ионной силе, длительность процесса должна быть минимальной, чтобы избежать опасности протеолиза или бактериального загрязнения.

Очень желательно закристаллизовать фермент сразу по окончании его очистки. Это делается не только для того, чтобы показать, что фермент чистый и находится в стабилизирующих условиях, но и для того, чтобы убедиться в ненужности какой-либо дальнейшей его очистки. Выделение завершено, и можно приступить к характеристике ферментного белка.

Этими замечаниями по кристаллизации мы заканчиваем книгу и надеемся, что многие исследователи, занимающиеся очисткой ферментов, теперь смогут быстрее реализовать свои планы

и согласятся с автором, что очистка белка — это не просто каторжный труд и не поиски случайной удачи, а вполне респектабельное и приносящее удовлетворение занятие.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

Gordon A. H. (1979). Electrophoresis of proteins in polyacrylamide and starch gels. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work T. S. and Burdon R. M., eds.), vol. 1, Part I, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.

Hames B., Rickwood D. (1981). Gel electrophoresis of proteins, IRL Press, London.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Этот раздел содержит таблицы для расчета количества осадителя, которое необходимо добавить в раствор.

Таблица I: Твердый сульфат аммония.

Количество сульфата аммония (твердого), которое необходимо добавить к раствору, уже содержащему эту соль со степенью насыщения S_1%, для того чтобы получить степень насыщения S_2%. Для 1 л раствора:

$$\text{Количество (г)} = \frac{533\,(S_2 - S_1)}{100 - 0{,}3S_2}.$$

Таблица II: Органический растворитель, или насыщенный сульфат аммония.

Объем смешивающейся жидкости (органического растворителя или насыщенного раствора сульфата аммония), который необходимо добавить к раствору, уже содержащему C_1% (по объему) этой жидкости, для получения концентрации C_2% (по объему). Для 1 л раствора:

$$\text{Объем (мл)} = \frac{10\,(C_2 - C_1)}{100 - C_2}.$$

Таблица I. Количество сульфата аммония (в граммах), добавляемое к 1 л раствора

От S_1 % ↘ До S_2% →	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0	27	55	84	113	144	176	208	242	277
5		27	56	85	115	146	179	212	246
10			28	57	86	117	149	182	216
15				28	58	88	119	151	185
20					29	59	89	121	154
25						29	60	91	123
30							30	61	92
35								30	62
40									31
45									
50									

От S_1%	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	282	319	357	397	439	481	526	572	621	671	723
10	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	219	255	292	331	371	413	456	501	548	596	647
20	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25	157	191	227	265	304	344	386	429	475	522	571
30	126	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45	31	64	97	132	169	206	245	286	329	373	419
50		32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55			33	66	101	138	175	215	256	298	343
60				33	67	103	140	179	219	261	305
65					34	69	105	143	183	224	266
70						34	70	107	146	186	228
75							35	72	110	149	190
80								36	73	112	152
85									37	75	114
90										37	76
95											38

Таблица II. Объем растворителя (в мл), добавляемый к 1 л раствора

От C_1% \ До C_2%→	5	10	15	20	25	30	35	40	45
0	52	111	176	250	333	428	538	666	818
5		55	117	187	266	357	461	583	727
10			58	125	200	285	384	500	636
15				62	133	214	307	416	545
20					66	142	230	333	454
25						71	153	250	363
30							76	166	272
35								83	181
40									90
45									
50									

От C_1 %	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95
0	1000	1222	1500	1857	2333	3000	4000	5666	9000	19 000
5	900	1111	1375	1714	2166	2800	3750	5333	8500	18 000
10	800	1000	1250	1571	2000	2600	3500	5000	8000	17 000
15	700	888	1125	1428	1833	2400	3250	4666	7500	16 000
20	600	777	1000	1285	1666	2200	3000	4333	7000	15 000
25	500	666	875	1142	1500	2000	2750	4000	6500	14 000
30	400	555	750	1000	1333	1800	2500	3666	6000	13 000
35	300	444	625	857	1166	1600	2250	3333	5500	12 000
40	200	333	500	714	1000	1400	2000	3000	5000	11 000
45	100	222	375	571	833	1200	1750	2666	4500	10 000
50		111	250	428	666	1000	1500	2333	4000	9 000
55			125	285	500	800	1250	2000	3500	8 000
60				142	333	600	1000	1666	3000	7 000
65					166	400	750	1333	2500	6 000
70						200	500	1000	2000	5 000
75							250	666	1500	4 000
80								333	1000	3 000
85									500	2 000
90										1 000

РАСТВОРЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ БЕЛКА

1. БИУРЕТОВАЯ РЕАКЦИЯ [202]

Растворяют 1,5 г сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и 6,0 г тартрата калия и натрия в 500 мл воды. Добавляют 300 мл 10%-ной гидроокиси натрия и доводят объем водой до 1 л. Если к этому раствору добавить еще 1 г иодида калия, то реактив будет храниться в пластиковом сосуде в течение неопределенно долгого времени.

Определение белка

К 0,5 мл раствора белка неизвестной концентрации (до 3 мг) добавляют 2,5 мл реактива. Перед измерением оптической плотности при 540 нм раствор выдерживают 20—30 мин.

2. РЕАКЦИЯ ЛОУРИ [171]

Реактив А. Растворяют 0,5 г сульфата меди ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) и 1 г цитрата натрия (Na_3-цитрат) в 100 мл воды. Этот раствор хранится неопределенно долгое время и более устойчив, чем обычная медьтартратная смесь [202].

Реактив В. 20 г карбоната натрия (Na_2CO_3) и 4 г гидроокиси натрия растворяют в 1 л воды.

Реактив С. К 50 мл реактива В добавляют 1 мл реактива А.

Реактив D. К 10 мл реактива Фолина—Чиокалто добавляют 10 мл воды.

Определение белка

К 0,5 мл неизвестного раствора, содержащего не более 0,5 мг белка, добавляют 2,5 мл реактива С, перемешивают и оставляют на 5—10 мин. Затем добавляют 0,25 мл реактива D. Раствор тщательно перемешивают и оставляют на 20—30 мин, развившуюся окраску измеряют при подходящей длине волны между 600 и 750 нм. Следует заметить, что из-за различий в силе реактива Фолина—Чиокалто развитие окраски может быть неудов-

летворительным. Степень разбавления этого реактива (или количество добавляемого реактива) можно изменять таким образом, чтобы после добавления реактивов C и D pH конечной смеси находился между 10,0 и 10,5. При более высоких значениях pH окраска развивается быстрее, но и быстрее исчезает.

В автоматизированных системах, в которых время реакции точно контролируется, более предпочтительно быстрое развитие окраски при pH 11,0; для этого необходимо повысить концентрацию NaOH в реактиве B до 30—40%.

3. СВЯЗЫВАНИЕ БЕЛКА С КУМАССИ СИНИМ

а) 100 мг кумасси ярко-синего G-250 растворяют при энергичном перемешивании в 50 мл 95%-ного этанола и смешивают этот раствор со 100 мл 85%-ной фосфорной кислоты. Смесь разбавляют до 1 л водой и фильтруют для удаления нерастворившегося красителя. Раствор устойчив 1—2 нед.

б) 60 мг кумасси ярко-синего G-250 растворяют в 1 л 3%-ной надхлорной кислоты и фильтруют для удаления нерастворившегося красителя. Величина поглощения при 465 нм должна быть между 1,3 и 1,5. Этот раствор устойчив в течение неопределенно долгого времени.

Определение белка

К 1,5 мл образца, содержащего не более 50 мкг белка, добавляют 1,5 мл реактива; через 20—30 мин измеряют поглощение при 595 нм. Если имеют дело с концентрированными белковыми растворами (>5 мг/мл), удобнее взять 1,5 мл воды или разбавленного раствора хлористого натрия, добавить образец при помощи микролитрового шприца, тщательно перемешать раствор и затем добавить в него красящий реактив. Концентрированный белковый раствор при контакте с красящим реактивом будет давать осадок. Реактив *а*) дает более высокое поглощение, чем реактив *б*), но он менее устойчив.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Demain A. L.* Increasing enzyme production by genetic and environmental manipulations, Meth. Enzymol., **22**, 86—95 (1971).
2. *Roberts T. M., Lauer G. D.* Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro, Meth. Enzymol., **68**, 473—482 (1979).
3. *Smiley K. L., Berry A. J., Suelter C. H.* An improved purification, crystallization, and some properties of rabbit muscle 5′-adenylic acid deaminase, J. Biol. Chem., **242**, 2502—2506 (1967).
4. *Van de Berg L., Rose D.* Effect of freezing on the pH and composition of sodium and potassium phosphate solution: The reciprocal system KH_2PO_4—Na_2HPO_4—H_2O, Arch. Biochem. Biophys., **81**, 319—329 (1959).
5. *Orii Y., Morita M.* Measurement of the pH of frozen buffer solutions by using pH indicators, J. Biochem., **81**, 163—168 (1977).
6. *Tyler D. D., Gonze J.* The preparation of heart mitochondria from laboratory animals, Meth. Enzymol., **10**, 75—77 (1967).
7. *Tsuchihashi M.* Blood catalase, Biochem. Z., **140**, 63—112 (1923).
8. *Lazarus N. R., Ramel A. H., Rustrum Y. M., Barnard E. A.* Yeast hexokinase. I. Preparation of the pure enzyme, Biochemistry, **5**, 4003—4016 (1966).
9. *Rutter W. J., Hunsley J. R.* Fructose diphosphate aldolase from yeast, Meth. Enzymol., **9**, 480—486 (1966).
10. *Yun S. L., Aust A. E., Suelter C. H.* A revised preparation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) pyruvate kinase, J. Biol. Chem., **251**, 124—128 (1976).
11. *Takagahara I., Suzuki Y., Fujita T., Yamauti J., Fujii K., Yamashita J., Horio T.* (1978). Successive purification of several enzymes having affinities for phosphoric groups of substrates by affinity chromatography on P-cellulose, J. Biochem., **83**, 585—597 (1978).
12. *Ito Y., Tomasselli A. G., Noda L. H.* ATP: AMP phosphotransferase from baker's yeast, Eur. J. Biochem., **105**, 85—92 (1980).
13. *de la Morena E., Santos I., Grisolia S.* Homogenous crystalline phosphoglycerate phosphomutase of high activity: A simple method for lysis of yeast, Biochim. Biophys. Acta, **151**, 526—528 (1968).
14. *Schwinghamer E. A.* A method for improved lysis of some gram-negative bacteria, FEMS Microbiol. Lett., **7**, 157—162 (1980).
15. *Clarke F. M., Masters C. J.* Interactions between muscle proteins and glycolytic enzymes, Int. J. Biochem., **7**, 359—365 (1976).
16. *Reed L. J., Mukkerjee B. B.* α-Ketoglutarate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*, Meth. Enzymol., **13**, 55—61 (1969).
17. *Welch P., Scopes R. K.* Rapid purification and crystallisation of yeast phosphofructokinase, Anat. Biochem., **110**, 154—157 (1981).
18. *Scopes R. K.* An improved procedure for the isolation of 3-phosphoglycerate kinase from yeast, Biochem. J., **122**, 89—92 (1971).
19. *Penefsky H. S., Tzagoloff A.* Extraction of water-soluble enzymes and proteins from membranes, Meth. Enzymol., **22**, 204—219 (1971).

20. *Keilin D., Hartree E. F.* Activity of the cytochrome system in heart muscle, Biochem. J., **41**, 500—502 (1947).
21. *Penefsky H. S.* Preparation of beef heart mitochondrial ATPase, Meth. Enzymol., **55**, 504—508 (1979).
22. *Hjelmeland L. M.* A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and synthesis, Proc. Nat. Acad. Sci., **77**, 6368—6370 (1980).
23. *Furth A. J.* Removing unbound detergent from hydrophobic proteins, Anat. Biochem., **109**, 207—215 (1980).
24. *Srere P. A.* The infrastructure of the mitochondrial matrix, Trends Biochem. Sci., **5**, 120—121 (1980).
25. *Tanford C.* The hydrophobic effect: Formation of micelles and biological membranes, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, 1980.
26. *Melander W., Horvath C.* Salt effects on hydrophobic interactions in precipitation and chromatography of proteins: An interpretation of the lyotropic series, Arch. Biochem. Biophys., **183**, 200—215 (1977).
27. *Czok R., Bücher T.* Crystallised enzymes from the myogen of rabbit skeletal muscle, Advan. Prot. Chem., **15**, 315—415 (1960).
28. *Scopes R. K., Stoter A.* All the glycolytic enzymes from one muscle extract, Meth. Enzymol., **90** (1982) (in press).
29. *Scopes R. K.* Techniques for protein purification. In: Techniques in the life sciences, vol. B101, pp. 1—42, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
30. *Curling J. M.* (ed.). Methods of plasma protein fractionation, Academic Press, New York, 1980.
31. *Askonas B. A.* The use of organic solvents at low temperature for the separation of enzymes: Application to aqueous rabbit muscle extract, Biochem. J., **48**, 42—48 (1951).
32. *Polson A., Potgieter G. M., Largier J. F., Mears G. E. F., Joubert F. J.* The fractionation of protein mixtures by linear polymers of high molecular weight, Biochim. Biophys. Acta, **82**, 463—475 (1964).
33. *Sternberg M., Hershberher D.* Separation of proteins with polyacrylic acids, Biochim. Biophys. Acta, **342**, 195—206 (1974).
34. *Kuby S. A., Noda L., Lardy H. A.* Adenosinetriphosphate-creatine transphosphorylase. I. Isolation of the crystalline enzyme from rabbit muscle, J. Biol. Chem., **209**, 191—201 (1954).
35. *Scopes R. K., Griffith-Smith K., Millar D. G.* Rapid purification of yeast alcohol dehydrogenase, Anal. Biochem., **118**, 284—285 (1981).
36. *Yoshida A., Watanabe S.* Human phosphoglycerate kinase. I. Crystallisation and characterisation of normal enzyme, J. Biol. Chem., **247**, 440—445 (1972).
37. *Peterson E. A., Sober H. A.* Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents, J. Amer. Chem. Soc., **78**, 751—755 (1956).
38. *Scopes R. K.* Quantitative studies of ion-exchange and affinity elution chromatography of enzymes, Anal. Biochem., **114**, 8—18 (1981).
39. *Peterson E. A.* Cellulosic ion-exchangers. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology (Work T. S. and Work E., eds.), vol. 2, Pt. 2, pp. 223—392. North-Holland, Amsterdam, 1970.
40. LKB Produkter AB Publications. DEAE/CM Trisacryl M for ion-exchange chromatography, Bromma, Sweden, 1981.
41. Pharmacia Fine Chemicals AB Publications. Ion-exchange chromatography, Principles and methods, Uppsala, 1980.
42. *Sluyterman L. A. A., Elgersma O.* Chromatofocusing: Isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles, J. Chromatogr., **150**, 17—30 (1978).
43. *Sluyterman L. A. A., Elgersma O.* Chromatofocusing: Isoelectric focusing on ion-exchange columns. II. Experimental verification, J. Chromatogr., **150**, 31—44 (1978).

44. *Sluyterman L. A. A., Wijdenes J.* Chromatofocusing. III. The properties of a DEAE-agarose anion exchanger and its suitability for protein separations, J. Chromatogr., **206**, 429—440 (1981).
45. *Sluyterman L. A. A., Wijdenes J.* Chromatofocusing. IV. Properties of an agarose polyethyleneimine ion-exchanger and its suitability for protein separations, J. Chromatogr., **206**, 441—447 (1981).
46. Pharmacia Fine Chemicals AB Publications. Chromatofocusing with Polubuffer™ and PBE™, Uppsala, 1981.
47. *Watts D. C., Rabin B. R.* A study of the «reactive» sulfhydryl groups of adenosine 5'-triphosphate-creatine phosphotransferase, Biochem. J., **85**, 507—516 (1962).
48. *Algar E., Scopes R. K.* Yeast phosphoglycerate kinase: Evidence from affinity elution studies for conformational changes on binding of substrates, FEBS Lett., **106**, 239—242 (1979).
49. *Stewart A. A., Scopes R. K.* Phosphoglycerate kinase from ram testes, Eur. J. Biochem., **85**, 89—95 (1978).
50. *Datta S. P., Grzybowski A. K.* pH and acid-base equilibrium. In: Biochemist's handbook (Long C., ed.), pp. 19—58, Spon, London, 1961.
51. *Perrin D. D., Dempsey B.* Buffers for pH and metal ion control, Chapman and Hall, London, 1974.
52. *McKenzie H. A., Dawson R. M. C.* pH and buffers and physiological media. In: Data for biochemical research (Dawson R. M. C., Elliott D. C., Elliott W. H. and Jones K. M., eds.), pp. 475—508, Oxford University Press, London, 1969.
53. *Barnard E. A.* Hexokinase from yeast, Meth. Enzymol., **42**, 6—20 (1975).
54. *Pogell B. N.* Enzyme purification by selective elution with substrate from substituted cellulose columns, Biochem. Biophys. Res. Commun., **7**, 225—230 (1962).
55. *Black W. S., van Tol A., Fernando S., Horecker B. L.* Isolation of a highly active fructose diphosphatase from rabbit muscle: Its subunit structure and activation by monovalent cations, Arch. Biochem. Biophys., **151**, 576—590 (1972).
56. *Scopes R. K.* Purification of clycolytic enzymes by using affinity elution chromatography, Biochem. J., **161**, 253—263 (1977).
57. *Scopes R. K.* Multiple enzyme purifications from muscle extracts by using affinity elution chromatographic procedures, Biochem. J., **161**, 265—277 (1977).
58. *von der Haar F.* Affinity elution principles and applications to purification of aminoacyl-tRNA synthetases, Meth. Enzymol., **34**, 163—171 (1974).
59. *Bennet W. S., Steitz T. A.* Glucose-induced conformational change in yeast hexokinase, Proc. Nat. Acad. Sci., **75**, 4848—4852 (1978).
60. *Pickover C. A., McKay D. B., Engelman M. D., Steitz T. A.* Substrate binding closes the cleft between the domains of yeast phosphoglycerate kinase, J. Biol. Chem., **254**, 11323—11329 (1979).
61. *von der Haar F.* Affinity elution as a purification method for aminoacyl-tRNA synthetases, Eur. J. Biochem., **34**, 84—90 (1973).
62. *Chilla R., Doering K. M., Domagk G. F., Rippa M.* A simplified procedure for the isolation of a highly active crystalline glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Candida utilis*, Arch. Biochem. Biophys., **159**, 235—239 (1973).
63. *Qadri S. S., Easterby J. S.* Purification of skeletal muscle hexokinase by affinity elution chromatography, Anal. Biochem., **105**, 299—303 (1980).
64. *Yon R. J.* Chromatography of lipophilic proteins on adsorbents containing mixed hydrophobic and ionic groups, Biochem. J., **126**, 765—767 (1972).
65. *Yon R. J., Simmonds R. J.* Protein chromatography on adsorbents with hydrophobic and ionic groups: Some properties on N-(3-carboxypropionyl)aminodecyl-Sepharose and its interaction with wheat-germ aspartate transcarbamylase, Biochem. J., **151**, 281—290 (1975).

66. *Yon R. J.* Biospecific-elution chromatography with «imphilytes» as stationary phases, Biochem. J., **161**, 233—237 (1977).
67. *Yon R. J.* Versatility of mixed-function adsorbents in biospecific protein desorption: Accidental affinity and an improved purification of aspartate transcarbamoylase from wheat germ, Anal. Biochem., **113**, 219—228 (1981).
68. *Porath J., Fryklund L.* Chromatography of proteins on dipolar ion adsorbents, Nature, **226**, 1167—1170 (1970).
69. *Porath J., Farnstedt N.* Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchangers, J. Chromatogr., **51**, 479—489 (1970).
70. *Grossman L., Moldave K.* (eds.). Nucleic acid synthesizing systems, Meth. Enzymol., **29**, 1—230 (1974).
71. *Turkova J.* Affinity chromatography, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1978.
72. *Trayer I. P.* Affinity chromatography. In: Techniques in the life sciences, vol. **B102**, pp. 1—34, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1978.
73. *Lowe C. R.* Affinity chromatography: The current status, Int. J. Biochem., 8, 177—181 (1977).
74. *Trayer I. P., Trayer H. R., Small D. A. P., Bottomly R. C.* Preparation of adenosine nucleotide derivatives for affinity chromatography, Biochem. J., **139**, 609—623 (1974).
75. *Cuatrecasas P., Wilchek M., Anfinsen C. D.* Selective enzyme purification by affinity chromatography, Proc. Nat. Acad. Sci., **61**, 636—643 (1968).
76. *March S. C., Parikh I., Cuatrecasas P.* A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography, Anal. Biochem., **60**, 149—152 (1974).
77. *Wilchek M., Oka T., Topper Y. J.* Structure of soluble superactive insulin is revealed by the nature of the complex between cyanogen-bromide-activated Sepharose and amines, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 1055—1058 (1975).
78. *Sunderberg L., Porath J.* Preparation of adsorbents for biospecific affinity chromatography. I. Attachment of group containing ligands to insoluble polymers by means of bifunctional oxiranes, J. Chromatogr., **90**, 87—98 (1974).
79. *Bethell G. S., Ayers J. S., Hancock W. S., Hearn M. T. W.* A novel method of activation of cross-linked agaroses with 1,1′-carbonyldiimidazole which gives a metrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups, J. Biol. Chem., **254**, 2572—2574 (1979).
80. *Nilsson K., Mosbach K.* p-Toluenesulfonyl chloride as an activating agent of agarose for the preparation of immobilized affinity ligands and proteins, Eur. J. Biochem., **112**, 397—402 (1980).
81. *Nilsson K., Mosbach K.* Immobilisation of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulphonyl chlorides, Biochem. Biophys. Res. Commun., **102**, 449—457 (1981).
82. *Lee C.-Y., Chen A. F.* Immobilized coenzymes and derivatives. In: Pyridine nucleotide coenzymes (Everse J., Anderson B. M. and Yon K. S., eds.), Academic Press, New York, 1980.
83. *O'Carra P., Barry S., Griffin T.* Spacer arms in affinity chromatography: Use of hydrophilic arms to control or eliminate non-biospecific adsorption effects, FEBS Lett., **43**, 169—175 (1974).
84. *Lowe C. R.* The synthesis of several 8-substituted derivatives of adenosine 5′-monophosphate to study the effect of the nature of the specer arm in affinity chromatography, Eur. J. Biochem., **73**, 265—274 (1977).
85. *Wright C. L., Warsy A. S., Holroyde M. J., Trayer I. P.* Purification of the hexokinases by affinity chromatography on Sepharose-N-aminoacylglucosamine derivatives, Biochem. J., **175**, 125—135 (1978).
86. *Aplin J. D., Hall L. D.* Sepharose 4 B as a matrix for affinity chromatography: A spin-labelling investigation using nitroxides as model ligands, Eur. J. Biochem., **110**, 295—309 (1980).
87. *Morgan M. R. A., George E., Dean P. D. G.* Investigation into the control-

ling factors of electrophoretic desorption: A widely applicable, nonchaotropic elution technique in affinity chromatography, Anal. Biochem., **105**, 1—5 (1980).
88. *Haeckel R., Hess B., Lauterborn W., Wurster K.* Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **349**, 699—714 (1968).
89. *Kopperschläger G., Freyer R., Diezel W., Hofmann E.* Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase, FEBS Lett., **1**, 137—141 (1968).
90. *Thompson S. T., Cass K. H., Stellwagen E.* Blue dextran-Sepharose: An affinity column for the dinucleotide fold in proteins, Proc. Nat. Acad. Sci., **72**, 669—672 (1975).
91. *Biellmann J. F., Samama J. P., Bränden C. I., Eklund H.* X-ray studies on the binding of Cibacron Blue F3G-A to liver alcohol dehydrogenase, Eur. J. Biochem., **102**, 107—110 (1979).
92. *Watson D. H., Harvey M. J., Dean P. D. G.* The selective retardation of $NADP^+$-dependent dehydrogenases by immobilised Procion HE-3B, Biochem. J., **173**, 591—596 (1978).
93. Amicon Corporation Publications. Dye ligand chromatography: Applications, methods, theory of Mātrex™ gel media, Lexington, Mass., 1980.
94. *Ashton A., Polya G. M.* The specific interaction of Cibacron and related dyes with cyclic nucleotide phosphodiesterase and lactate dehydrogenase, Biochem. J., **175**, 501—506 (1978).
95. *Clonis Y. D., Lowe C. R.* Triazine dyes, a new class of Affinity labels for nucleotide-dependent enzymes, Biochem. J., **191**, 247—251 (1980).
96. *Qadri F., Fean P. D. G.* The use of various immobilized triazine affinity dyes for the purification of 6-phosphogluconate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus,* Biochem. J., **191**, 53—62 (1980).
97. *Atkinson T., Hammond P. M., Hartwell R. D., Hughes P., Scawen M. D., Sherwood R. F., Small D. A. P., Bruton C. J., Harvey M. J., Lowe C. R.* Triazine-dye affinity chromatography, Biochem. Soc. Trans., **9**, 290—293 (1981).
98. *Lowe C. R., Hans M., Spibey N., Drabble W. T.* The purification of inosine 5'-monophosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* by affinity chromatography on immobilised Procion dyes, Anal. Biochem., **104**, 23—28 (1980).
99. *Kessler S. W.* Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: Parameters of the interaction of antibodyantigen complexes with protein A, J. Immunol., **115**, 1617—1624 (1975).
100. *Spielman H., Erikson R. P., Epstein C. J.* The production of antibodies against mammalian LDH-1, Anal. Biochem., **59**, 462—467 (1974).
101. *Livingstone D. M.* Immunoaffinity chromatography of proteins, Meth. Enzymol., **34**, 723—731 (1974).
102. *van Wezel A. L., van der Marel P.* The application of immunoadsorption on immobilized antibodies for large scale concentration and purification of vaccines. In: Affinity chromatography and related techniques (Gribnau T. C. J., Visser J., Nivard R. J. F., eds.), pp. 282—292, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1982.
103. *Vidal J., Godbillon G., Gadal P.* Recovery of active, highly purified phosphoenolpyruvate carboxylase from specific immunoadsorbent column, FEBS Lett., **118**, 31—34 (1980).
104. *Biveau D., Daussant J.* Immunoaffinity chromatography of proteins: A gentle and simple desorption procedure, J. Immunol. Meth., **41**, 187—392 (1981).
105. *Singh P., Lewis S. D., Schafer J. A.* A support for affinity chromatography that covalently binds amino groups via a cleavable connector arm, Arch. Biochem. Biophys., **193**, 284—293 (1979).

106. *Eisenbarth G. S.* Application of monoclonal antibody techniques to biochemical research, Anat. Biochem., **111**, 1—16 (1981).
107. *Secher D. S., Burke D. C.* A monoclonal antibody for large scale purification of human leukocyte interferon, Nature, **285**, 446—450 (1980).
108. *Hauri H. P., Quaroni A., Isselbacher K. J.* Monoclonal antibodies to sucrase/isomaltase: Probes for the study of postnatal development and biogenesis of the intestinal microvillus membrane, Proc. Nat. Acad. Sci., **77**, 6629—6633 (1980).
109. *Bernardi G., Giro M. G., Gaillard C.* Chromatography of polypeptides and proteins on hydroxyapatite column: Some new developments, Biochim. Biophys. Acta, **278**, 409—420 (1972).
110. *Gluekauf E., Patterson L.* The adsorption of some proteins on hydroxyapatite and other adsorbents used for chromatographic separations, Biochim. Biophys. Acta, **351**, 57—76 (1974).
111. *Nakagawa Y., Noltmann E. A.* Isolation of phosphoglucose isomerase from brewer's yeast, J. Biol. Chem., **240**, 1877—1881 (1965).
112. *Keilin D., Hartree F. E.* Mechanism of the decomposition of hydrogen peroxide by catalase, Proc. Roy. Soc., B **124**, 387—405 (1938).
113. *Bernardi G.* Chromatography of proteins on hydroxyapatite, Meth. Enzymol., **22**, 325—339 (1971).
114. LKB-Produkter AB Publications. HA-Ultrogel: Hydroxyapatite-agarose gel for adsorption chromatography, Bromma, Sweden, 1980.
115. *Er-el Z., Zaidenzaig Y., Shaltiel S.* Hydrocarbon-coated Sepharoses: Use in the purification of glycogen phosphorylase, Biochem. Biophys. Res. Commun., **49**, 383—390 (1972).
116. *Hofstee B. H. J., Otillio N. F.* Modifying factors in hydrophobic protein binding by substituted agaroses, J. Chromatogr., **161**, 153—163 (1978).
117. *Ochoa J. L.* Hydrophobic (interaction) chromatography, Biochimie, **60**, 1—15 (1978).
118. *Hoffmann L. G.* Solubility chromatography of serum proteins. I. Isolation of the first component of complement from guinea pig serum by solubility chromatography at low ionic strength, J. Chromatogr., **40**, 39—52 (1969).
119. *Hoffmann L. G., McGivern P. W.* Solubility chromatography of serum proteins. II. Partial purification of the second component of guinea pig complement by solubility chromatography in concentrated ammonium sulphate solutions, J. Chromatogr., **40**, 53—61 (1969).
120. *Fujita T., Suzuki Y., Yamauti J., Takagahara I., Fujii K., Yamashita J., Horio T.* Chromatography in presence of high concentrations of salts on columns of celluloses with and without ion exchange groups (hydrogen bond chromatography), J. Biochem., **87**, 89—100 (1980).
121. *von der Haar F.* Purification of proteins by fractional interfacial salting out on unsubstituted agarose gels, Biochem. Biophys. Res. Commun., **70**, 1009—1013 (1976).
122. *von der Haar F.* The ligand-induced solubility shift in salting out chromatography: A new affinity technique, demonstrated with phenylalanyl- and isoleucyl-tRNA synthetase from baker's yeast, FEBS Lett., **94**, 371—374 (1978).
123. *Reed L. K., Mukherjee B. D.* α-Ketoglutarate dehydrogenase complex from *Escherichia coli*, Meth. Enzymol., **13**, 55—61 (1969).
124. Amicon Corporation Publications Boronate ligands in biochemical separations: Applications, method, theory of Mātrex gel PBS, Lexington, Mass., 1981.
125. *Porath J., Flodin P.* Gel filtration: A method for desalting and group separation, Nature, 83, 1657—1659 (1959).
126. *Whitaker J. R.* Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex, Anal. Chem., **35**, 1950—1953 (1963).

127. *Andrews P.* The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range, Biochem. J., **96**, 595—606 (1965).
128. *Smithies O.* Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal human adults, Biochem. J., **61**, 629—641 (1955).
129. *Ornstein L.* Disc electrophoresis. I. Background and theory, Ann. N. Y. Acad. Sci., **121**, 321—349 (1964).
130. *Rüchel R., Brager M. D.* Scanning electron microscopic observations of polyacrylamide gels, Anal. Biochem., **68**, 415—428 (1975).
131. *Morris C. J. O. R., Morris P.* Molecular-sieve chromatography and electrophoresis in polyacrylamide gels, Biochem. J., **124**, 517—528 (1971).
132. *Weber K., Osborn M.* The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem., **244**, 4406—4412 (1969).
133. *Goodman W. F., Baptist J. N.* Isoelectric point electrophoresis: A new technique for protein purification, J. Chromatogr., **179**, 330—332 (1979).
134. *Raymond S.* Protein purification by elution convection electrophoresis, Science, **146**, 406—407 (1964).
135. *Jovin T., Chrambach A., Naughton M. A.* An apparatus for preparative temperature-regulated polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem., 9, 351—369 (1964).
136. *Furlong C. E., Cirakoglu C., Willis R. C., Santy P. A.* A simple preparative polyacrylamide disc gel electrophoresis apparatus: Purification of three branched-chain amino acid binding proteins from *Escherichia coli*, Anal. Biochem., **51**, 297—311 (1973).
137. *Azuma J. I., Kashimura N., Komano T.* A new convenient column for gel electrophoresis, isoelectric focusing, and zonal electrophoresis, Anal. Biochem., **81**, 454—457 (1977).
138. *Walters J. A. L. I., Bont W. S.* An improved method for the separation of proteins by zonal electrophoresis on density gradients, Anal. Biochem., **93**, 41—45 (1979).
139. *Orr M. D., Blakeley R. L., Panagou D.* Discontinuous buffer systems for analytical and preparative electrophoresis of enzymes on polyacrylamide gel, Anal. Biochem., **45**, 68—85 (1972).
140. *Bog-Hansen T. C.* Crossed immuno-affinoelectrophoresis: An analytical method to predict the result of affinity chromatography, Anal. Biochem., **56**, 480—488 (1973).
141. *Hořejší V., Kocourek J.* Affinity electrophoresis: Separation of phytohemagglutinins on *O*-glycosyl polyacrylamide gels, Meth. Enzymol., **34**, 178—181 (1974).
142. *Tichá M., Hořejší V., Barthová J.* Affinity electrophoresis of proteins interacting with blue dextran, Biochim. Biophys. Acta, **534**, 58—63 (1978).
143. *Hořejší V.* Review: Affinity electrophoresis, Anal. Biochem., **112**, 1—8 (1981).
144. *Righetti P. G., Gianazza E., Brenna O., Galante E.* Isoelectric focusing as a puzzle, J. Chromatogr., **137**, 171—181 (1977).
145. *Nguyen N. Y., Rodbard D., Svendsen P. J., Chrambach A.* Cascade stacking and cascade electrofocusing: Their interconversion and fundamental unity, Anal. Biochem., **77**, 39—55 (1977).
146. *Nguyen N. Y., Chrambach A.* Natural pH gradients in buffer mixtures: Formation in the absence of strongly acidic and basic anolyte and catholyte, gradient steepening by sucrose, and stabilization by high buffer concentrations in the electrolyte chambers, Anal. Biochem., **79**, 462—469 (1977).
147. *Prestidge R. L., Hearn M. T. W.* Preparative flatbed electrofocusing in granulated gels with natural pH gradients generated from simple buffers, Anal. Biochem., **97**, 95—102 (1979).
148. *Baumann G., Chrambach A.* Gram-preparative protein fractionation by iso-

tachophoresis: Isolation of human growth hormone isohormones, Proc. Nat. Acad. Sci., **73**, 732—736 (1976).
149. *Dobry A., Boyer-Kawenoki F.* Phase separation in polymer solution, J. Polym. Sci., **2**, 90—100 (1947).
150. *Albertsson P.-A.* In: Partition of cell particles and macromolecules, 2nd ed., pp. 24—25, Wiley, New York, 1971.
151. *Hartman A., Johansson G., Albertsson P.-A.* Partition of proteins in a three-phase system, Eur. J. Biochem., **46**, 75—81 (1974).
152. *Chaabouni A., Dellacherie E.* Affinity partition of proteins in aqueous two-phase systems containing polyoxyethylene glycol-bound ligand and charged dextrans, J. Chromatogr., **171**, 135—143 (1979).
153. *Kula M.-R.* Extraction and purification of enzymes using aqueous 2-phase systems. In: Applied biochemistry and bioengineering (Wingard L. B., Katchalski-Katzir E. and Goldstein L., eds.), vol. **2**, pp. 71—96, Academic Press, New York, 1979.
154. *Müller W., Bünemann H., Schuetz H.-J., Eigel A.* Nucleic acid interacting dyes suitable for affinity chromatography, partitioning, and affinity electrophoresis. In: Affinity chromatography and related techniques (Gribnau T. C. J., Visser J. and Nivard R. J. F., eds.), pp. 437—444, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1982.
155. *Illingworth J. A.* A common source of error in pH measurements, Biochem. J., **195**, 259—262 (1981).
156. *Cleland W. W.* Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups, Biochemistry, **3**, 480—482 (1964).
157. *de Duve C., Baudhuin P.* Peroxisomes (microbodies and related particles), Physiol. Rev., **46**, 323—357 (1966).
158. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry. Enzyme nomenclature, Academic Press, New York, 1978. (Есть перевод: Номенклатура ферментов. Москва 1979.)
159. *Gold A. M.* Sulfonylation with sulfonyl halides, Meth. Enzymol., **11**, 706—711 (1967).
160. *Umezawa H., Aoyagi T., Morishima H., Matsuzak M., Hamada M., Takeuchi T.* Pepstatin: A new pepsin inhibitor produced by actinomyces, J. Antibiot., **23**, 259—262 (1970).
161. *Kregar I., Uhr I., Smith R., Umezawa H., Turk V.* In: Intracellular protein catabolism (Turk V. and Marks N., eds.), vol. **2**, pp. 250—254, Plenum Press, New York, 1977.
162. *Gekko K., Timasheff S. N.* Thermodynamic and kinetic examination of protein stabilization by glycerol, Biochemistry, **20**, 4677—4686 (1981).
163. *Smith M. B., Oakenfall D. G., Back J. F.* Thermal stabilization of protein by sugars and polyols, Proc. Aust. Biochem. Soc., **11**, 4 (1978).
164. *Ramponi G., Guerritore A., Treves C., Nassi P., Baccari V.* Horse muscle acyl phosphatase: Purification and some properties, Arch. Biochem. Biophys., **130**, 362—369 (1969).
165. *Aust A. E., Suelter C. H.* Homogenate pyruvate kinase isolated from yeast by two different methods is indistinguishable from pyruvate kinase in cell-free extract, J. Biol. Chem., **253**, 7508—7512 (1978).
166. *Wormack F. C., Colowick S. P.* Proton-dependent inhibition of yeast and brain hexokinases by aluminum in ATP preparations, Proc. Nat. Acad. Sci., **76**, 5080—5084 (1979).
167. *Crabtree B., Leech A. R., Newholme E. A.* Measurement of enzymic activities in crude extracts of tissues. In: Techniques in the life sciences, vol. **B211**, pp. 1—37, Elsevier/North-Holland, Amsterdam, 1979.
168. *Scopes R. K.* Automated fluorometric analysis of biological compounds, Anal. Biochem., **49**, 73—87 (1972).
169. *Garciá-Carmona F., Garciá-Cánaves F., Lozano J. A.* Optimizing enzyme

assays with one or two coupling enzymes, Anal. Biochem., **113**, 286—291 (1981).
170. *Itzhaki R. F., Gill D. M.* A micro-biuret method for estimating protein, Anal. Biochem., **9**, 401—410 (1964).
171. *Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* Protein measurement with the Folin phenol reagent, J. Biol. Chem., **193**, 265—275 (1951).
172. *Folin O., Ciocalteau V.* Tyrosine and tryptophan determination in proteins, J. Biol. Chem., **73**, 627—650 (1927).
173. *Peterson G. L.* Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosenbrough, Farr, and Randall, Anal. Biochem., **100**, 201—220 (1979).
174. *Warburg O., Christian W.* Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, Biochem. Z., **310**, 384—421 (1941).
175. *Goldfarb A. R., Saidel L. J., Mosovich E.* The ultraviolet absorption spectra of proteins, J. Biol. Chem., **193**, 397—404 (1951).
176. *Wetlaufer D. R.* Ultraviolet spectra of proteins and amino acids, Advan. Prot. Chem., **17**, 303—390 (1962).
177. *Scopes R. K.* Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm, Anal. Biochem., **59**, 277—282 (1974).
178. *Bradford M. M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., **72**, 248—254 (1976).
179. *Spector T.* Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation, Anal. Biochem., **86**, 142—146 (1978).
180. *Reynolds J. A., Tanford C.* Binding of dodecyl sulphate to proteins at high binding ratios: Possible implications for the state of proteins in biological membranes, Proc. Nat. Acad. Sci., **66**, 1002—1007 (1970).
181. *Cavell S., Scopes R. K.* Isolation and characterisation of the «photosynthetic» phosphoglycerate kinase from *Beta vulgaris*, Eur. J. Biochem., **63**, 483—490 (1976).
182. *Arcus A. C.* Protein analysis by electrophoretic molecular sieving in a gel of graded porosity, Anal. Biochem., **37**, 53—63 (1970).
183. *Blakesly R. W., Boezi J. A.* A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250, Anal. Biochem., **82**, 580—582 (1977).
184. *Ditzel W., Kopperschläger G., Hoffmann E.* An improved procedure for protein staining in polyacrylamide gels with a new type of Coomassie Brilliant Blue, Anal. Biochem., **48**, 617—620 (1972).
185. *Malik N., Berrie A.* New stain fixative for proteins separated by gel isoelectric focusing based on Coomassie Brilliant Blue, Anal. Biochem., **49**, 173—176 (1972).
186. *Ortega M.* Use of nigrosine for staining proteins after electrophoresis on filter paper, Nature, **179**, 1086—1087 (1957).
187. *Ragland W. L., Pace J. L., Kemper D. L.* Fluorometric scanning of fluorescamine-labelled proteins in polyacrylamide gels, Anal. Biochem., **59**, 24—33 (1974).
188. *Wilson C. M.* Studies and critique of amido black 10B, Coomassie Blue R, and fast green FCF as stains for proteins after polyacrylamide gel electrophoresis, Anal. Biochem., **96**, 263—278 (1979).
189. *Higgins R. C., Dahmus M. E.* Rapid visualisation of protein bands in preparative SDS-polyacrylamide gels, Anal. Biochem., **93**, 257—260 (1979).
190. *Pace J. L., Kemper D. L., Ragland W. L.* The relationship of molecular weight to electrophoretic mobility of fluorescamine-labeled proteins in polyacrylamide gels, Biochem. Biophys. Res. Commun., **57**, 482—487 (1974).
191. *Sammons D. W., Adams L. D., Nishizawa E. E.* Ultrasensitive silver-based

colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels, Electrophoresis, **2**, 135—140 (1981).

192. *Schäfer H. J., Scheurich P., Rathgeber G. R.* A simple method of activity staining for phosphate-releasing enzymes in electrophoresis gels, Hoppe-Seyler's, Z. Physiol. Chem., **359**, 1441—1442 (1978).
193. *Edelhoch H.* Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins, Biochemistry, **6**, 1948—1954 (1967).
194. *Taylor J. F., Green A. A., Cori G. T.* Crystalline aldolase, J. Biol. Chem., **173**, 591—604 (1948).
195. *Scopes R. K.* A simple procedure for crystallisation of marsupial muscle phosphorylase, Proc. Aust. Biochem. Soc., **7**, 6 (1974).
196. *McPherson A.* Crystallisation of proteins from polyethylene glycol, J. Biol. Chem., **251**, 6300—6306 (1976).
197. *Albert T., Hartman F. C., Johnson R. M., Petsko G. A., Tsernoglou D.* Crystallisation of yeast triose phosphate isomerase from polyethylene glycol: Protein crystal formation following phase separation, J. Biol. Chem., **256**, 1356—1361 (1981).
198. *Kam Z., Shore H. B., Faher G.* On the crystallisation of proteins, J. Mol. Biol., **123**, 539—555 (1978).
199. *Carter C. W., Jr., Carter C. W.* Protein crystallisation using incomplete factorial experiments, J. Biol. Chem., **254**, 12219—12223 (1979).
200. *Weber B. H., Godkin P. E.* A modified microdiffusion procedure for the growth of single protein crystals by concentration-gradient equilibrium dialysis, Arch. Biochem. Biophys., **141**, 489—498 (1970).
201. *Henderson R.* Crystallising membrane proteins, Nature, **287**, 490 (1980).
202. *Gornall A. C., Bardawill C. J., David M. M.* Determination of serum proteins by means of the biuret reaction, J. Biol. Chem., **177**, 751—766 (1949).
203. *Leggett-Bailey J.* Techniques in protein chemistry, 2nd ed., pp. 340—346, Elsevier, Amsterdam, 1967.
204. *Sedmak J. J., Grossberg S. E.* A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G250, Anal. Biochem., **79**, 544—552 (1977).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

(Ад)сорбция «в объеме» 172, 178—181, 190—196
Агароза 92, 147, 164, 167—170, 183—184, 186—187. *См. также* Сефароза
— активация 148—151
Алкогольдегидрогеназа 90, 164
Аллостерические ферменты 281
Альдолаза, адсорбция и элюция 98—99, 136
— кристаллизация 333—334
— растворимость 64, 65
Амфолиты 113, 225—226, 229, 324
Антитела моноклональные 177—178
— поликлональные 173—175
Аффинная адсорбция хроматография 146—163
— элюция 133—146
Аффинное осаждение 187
Аффинный электрофорез 224—225

Бактерии 37, 45—46
Белки, измерение концентрации 310—315
— концентрирование 26—28
— растворимость в сульфате аммония 46
Биогель 32, 167, 200, 202, 203
Биоспецифическая элюция *см.* Аффинная элюция
Биуретовая реакция 311, 341
Бромциан 148, 149
Буферные растворы, приготовление 247—250
Буферы, влияние ионной силы 242—243
— — температуры 243—245
— для ионообменной хроматографии 120—123

«Всаливание» 60, 335
Высаливание 61—72. *См. также* Сульфат аммония
«Высаливающая» хроматография 185—187
Вязкость 50, 214, 216
— растворов сахарозы и глицерина 264

Гексокиназа, аффинная хроматография 155
— — элюция 145
— определение активности 294, 307—308
Гели фосфата кальция 178, 180—182
Гель-фильтрация 197—213
— скорость потока 212—213, 265
— сре́ды (таблица) 202
Гемоглобин, денатурация хлороформом 44, 90
Гидроксилапатит 178, 180—182
Гидрофобность (белков) 61—62
Гидрофобные адсорбенты 182—185, 196
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа 65, 89—90
Глицерин, вязкость 264
— как стабилизатор белков 258, 264
Глицерол-1-Р-дегидрогеназа 296, 297

Декстран(овые гели) 92, 107, 109, 167, 198, 219
— голубой 163—165
Денатурация 83—90, 251—252
— кислотная и щелочная 87—89
— органическими растворителями 89—90
— тепловая 84—86, 271
Диализ 28—31, 274

Диизопропилфторфосфат 257
Дитиотреитол, дитиоэритритол 253, 254
Диэтиламиноэтилсефароза (ДЭАЭ-сефароза) 108, 111
Диэтиламиноэтилцеллюлоза (ДЭАЭ-целлюлоза) 101, 109, 111, 118—121, 129, 158, 265
Додецилсульфат натрия (ДСН) 289, 292, 320—322
Доннана эффект 112
Дрожжи 36—37, 45
— пируваткиназа 282

Жидкостная хроматография высокого давления (разрешения) 205, 292
Жидкостно-жидкостная хроматография 236
Замораживание (белковых растворов) 259—260, 269
— изменения pH 38, 260

Изоионные точки 218
Изотахофорез 231—235
Изоэлектрическое осаждение 58—61
— фокусирование 225—231, 323—324
Иммуноадсорбенты 173—178, 196
Интерферон 171, 178
Ионообменникн 101—133
— адсорбционная емкость 105—107, 125
— кривые титровання 109—111
— получение граднентов 130—131
— размеры колонок 125—127
— типы 107—112
— элюция белка 113—116, 127—133
— — — афинная 133—146
— энергия взаимодействия белков с ними 104—105

Кальция фосфат *см.* Гели фосфата кальция
Карбоксиметилсефароза (КМ-сефароза) 111
Карбоксиметилцеллюлоза (КМ-целлюлоза) 101, 103—107, 118—121, 130, 137, 265
1,1'-Карбонилдиимидазол 150, 151

Каталитнческий центр, инактивация 252—255
Клеланда реактивы 253
Клетки, разрушение 39—42
Клупеин 50
Колоночная хроматография 19—25. *См. также* Гель-фильтрация
— — градиентная элюция 25
Кольрауша дискретные зоны 223, 232
Коэффициент распределения (при колоночной хроматографии) 94—99
Кристаллизация 332—337
Кумасси синий 315, 326, 342

Лактатдегидрогеназа, аффинная элюция 138, 144
— использованне в аналитических методах 298, 302—303
— определение активности 294
— растворимость 65
Лаурилсульфат *см.* Додецилсульфат натрия
Ленгмюра изотерма 96—97
Лиганды-красители 163—172
Лизоцим 45—46, 50, 106, 107, 312
Лоури метод 311
— реактивы 341

Малатдегидрогеназа 280—281
Мембранные белки, солюбилизация детергентами 53—54
β-Меркаптоэтанол 46, 48, 253—254
Митохондриальные белки 52—53
Михаэлиса — Ментен кинетика 278—280
Мочевина (при электрофорезе) 320
Мультифункциональные адсорбенты (адсорбенты со смешанными функциями) 145, 188—189. *См. также* Лиганды-красители

Неорганические адсорбенты 178—182
Непрерывно-периодический метод 306
Непрерывные методы (определения активности ферментов) 294—306
Никотинамидадениндинуклеотид (NAD) 164
— спектры поглощения и флуоресценции 280—281

Обессоливание (удаление солей) 28—33, 267, 268
Окрашивание (после электрофореза) 325—330
Органеллы, очистка 17
— ферменты 52—55
Органические растворители, влияние на pH 80
— — выбор 75—76
— — осаждение ими 72—81

Пепстатин А 46, 257, 258
Периодические методы (определения активности ферментов) 286—294
Пируваткиназа 283
— аффинная элюция 137, 138
— и голубой декстран 163
— растворимость 64, 65
Полиакриламид для гель-фильтрации 200, 215
— при аналитическом электрофорезе 317—320
— — препаративном электрофорезе 215
Полиакриловая кислота 82
Полиэтиленгликоль (ПЭГ) 28, 81—82, 236
Препаративный электрофорез вертикальный 220—223
— — горизонтальный 217—219
Протамин, протаминсульфат 50, 51, 133, 187—188
Протеазы, протеиназы *см.* Протеолитические ферменты
Протеолитические ферменты 86, 256—257
Процноновые красители 166, 168, 169
«Псевдоаффинные» адсорбенты 164
pH как денатурирующий фактор 87—88
— регулирование в растворах белков 248—249

Распределение (белков) между жидкими фазами 235—237

Сефадекс 31—32, 108—110, 167, 197, 200, 202, 203, 217, 265. *См. также* Декстран
Сефакрил 167, 201, 202, 205, 206, 265
Сефароза 108, 111, 147, 188, 202. *См. также* Агароза
Сефацел 108—109, 265
Сорбция «в объеме» *см.* Адсорбция «в объеме»
Стрептомицин 50
Субстратное ингибирование 281—282
Сульфат аммония, высаливание им 67—72, 338—340
— — кристаллизация из его раствора 334—336
Сульфгидрильные соединения 253—255. *См. также* β-Меркаптоэтанол

Температура, влияние на растворимость белков 65
— — — pH буферов 243—245
— и денатурация белков 84—86
— при добавлении органических растворителей 78
Термодинамика абсорбционной хроматографии 103—105
— буферов 240—245
— высаливания 62—63
— тепловой денатурации 84—85
Толуолсульфонилхлорид 150
Триозо-Р-изомераза 296, 297
Трисакрил 109
Тритон Х-100 46, 53—57

Удлиняющий мостик 147—148, 154, 166
— — расщепляемый 176
Ультрагель 161, 202, 203, 205, 206, 265
Ультрафильтрация 14, 27—28, 237—239
Ультрафиолет, поглощение белками 312—314
Ультрацентрифугирование 330

Фенилборная кислота 189—190
Фенилметилсульфонилфторид 46, 257
Ферменты, определение активности 277—310
Фильтрация 13—15
Фолина — Чиокалто реактив 311, 341

Фосфоглицераткиназа 105, 106, 138, 321
Фосфофруктокиназа 297—298
Фосфоцеллюлоза 107, 144—146
Фракционирование, достижение равновесия 265
Фруктозо-бисфосфатальдолаза 297

Хендерсона — Хассельбаха уравнение 241
Хроматография 19—25
«Хроматофокусирование» 113

Целлюлоза 92, 147, 186
— фосфат *см.* Фосфоцеллюлоза
Центрифугирование 15—19
Цибакрон голубой F3GA 163—166, 225, 236

Экстракция (клеточных белков) 39—46
Электрофорез 213—225
— аналитический 316—330
— аффинный 224
— в гелях с додецилсульфатом натрия 320—322
— — горизонтальных блоках 217—219
— — градиентных гелях 323
— — крахмальном геле 215, 216
— — полиакриламидном геле 215, 317—324
— вертикальные системы 220—223
— двумерный 324
— препаративный 217—223
— применение мочевины 320
— теория 214—216
Электроэндоосмос 219
Энтнера — Дудорова путь, ферменты 303
Эпоксиактивирование 150
Эритроциты 29

ОГЛАВЛЕНИЕ

От переводчика 5
Предисловие 6

Глава 1. Лаборатория очистки ферментов 10
1.1. Оборудование, специальные материалы и реактивы . . . 10
1.2. Отделение осадков и нерастворимых веществ 13
1.3. Принципы колоночной хроматографии 19
1.4. Некоторые приемы, используемые при работе с белковыми растворами 26

Глава 2. Приготовление экстракта 34
2.1. Исходный материал 34
2.2. Разрушение клеток и экстракция 39
2.3. Оптимизация и осветление экстракта 46
2.4 Методы, используемые при очистке ферментов, ассоциированных с частицами 52

Глава 3. Разделение белков путем осаждения 56
3.1. Общие положения 56
3.2. Растворимость белков при низкой концентрации солей . . 57
3.3. Высаливание при высокой концентрации соли 61
3.4. Осаждение белков органическими растворителями . . . 72
3.5. Осаждение белков органическими полимерами и другими веществами 81
3.6. Осаждение вследствие избирательной денатурации . . . 83

Глава 4. Разделение белков путем адсорбции 91
4.1. Теория хроматографии белков 91
4.2. Ионообменники: принципы, свойства и использование . . . 101
4.3. Ионообменная хроматография: практические аспекты . . . 116
4.4. Аффинная элюция с ионообменников и других неспецифических адсорбентов 133
4.5. Аффинная адсорбционная хроматография 146
4.6. Хроматография на окрашенных адсорбентах 163
4.7. Иммуноадсорбенты 173
4.8. Различные адсорбенты 178
4.9. Адсорбция «в объеме» 190
Рекомендуемая литература 196

Глава 5. Разделение в растворе 197
5.1. Гель-фильтрация 197
5.2. Электрофоретические методы: обычный электрофорез . . . 213
5.3. Изоэлектрическое фокусированне и изотахофорез 225
5.4. Распределение белков между жидкими фазами . . . 235
5.5. Ультрафильтрация 237
Рекомендуемая литература 239

Глава 6. Сохранение ферментов в активном состоянии 240
6.1. Контроль pH: буферы 240
6.2. Стабилизирующие факторы для ферментов 250

Глава 7. Оптимизация методов и соблюдение рекомендаций . . . 261
7.1. Быстрота и разрешение: временно́й фактор . . . 262
7.2. Увеличение и уменьшение масштабов операций 270
7.3. Воспроизведение опубликованной методики 273

Глава 8. Измерение активности ферментов 277
8.1. Основные особенности ферментативного катализа 277
8.2. Измерение активности с помощью периодических методов . 286
8.3. Измерение активности непрерывными методами 294
8.4. Практические аспекты определения активности ферментов . . 307
8.5. Методы измерения концентрации белка 310

Глава 9. Определение чистоты белков; кристаллизация 316
9.1. Электрофоретический анализ 316
9.2. Другие аналитические методы 330
9.3. Кристаллизация ферментов 332
Рекомендуемая литература 337

Приложение А 338

Приложение Б. Растворы для определения концентрации белка . . 341
1. Биуретовая реакция 341
2. Реакция Лоури 341
3. Связывание белка с кумасси синим 342

Литература 343

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛЬ!

Ваши замечания о содержании книги,
ее оформлении, качестве перевода и другие
просим присылать по адресу:
129820, Москва, И-110, ГСП
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»